

**Methodenentwicklung zur orts aufgelösten Untersuchung  
und Elementquantifizierung von Gewebeschnitten  
und von cis-Platin behandelten CHO-Zellen  
mittels Plasma-Massenspektrometrie nach Laser-Ablation**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Chemie  
der Universität Duisburg-Essen

von  
Sebastian D. Müller  
(geboren in Bottrop)

Essen, Februar 2012

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. R. Zellner

1. Gutachter: Prof. Dr. A. V. Hirner

2. Gutachter: PD Dr. W. Goedecke

Tag der Abgabe: 28.02.2012

Tag der mündlichen Prüfung: 04.07.2012

Meinen Eltern, die immer für mich da sind.

„Labor omnia vincit“

Hiermit erkläre ich gemäß § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

## Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Alfred Vitalis Hirner für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Umweltanalytik anfertigen zu dürfen, für die große thematische Freiheit, die mir beim Anfertigen dieser Arbeit gelassen wurde und für die beratende Unterstützung, wann immer ich sie benötigt habe.

Herrn PD Dr. Wolfgang Goedecke danke ich für die gute Kooperation, die zahlreichen anregenden wie auch kreativen Diskussionen und die Übernahme des Koreferats.

Mein Dank gebührt auch Prof. Dr. Andrea Vortkamp und ihren Mitarbeitern vom Zentrum für medizinische Biotechnologie (ZMB), die mir die Möglichkeit gegeben haben, an ihrem Kryomikrotom Gewebeschnitte und Gewebeäquivalentschnitte anzufertigen und mich in die praktische Arbeitsweise mit diesem Gerät eingewiesen haben.

Zu danken habe ich den Mitarbeiterinnen des Labors für Mikroanalytik und Thermoanalyse des Fachbereichs Anorganische Chemie, Frau Brauner und Frau Hiltenkamp, für die CHNS-Messungen, die ich zur Matrixcharakterisierung benötigt habe.

Ich danke den Mitarbeitern des Instituts für Umweltanalytik für die gute, kollegiale Arbeitsatmosphäre insbesondere Daniel, David, Frank, Jörg, Lars, Maria, Markus, Oliver, Roland, Stefanie, den Sulkowskis und last, but not least Birgit Wöstefeld.

Veronika und Axel, Christian, Flori, Sylvia, Tuomo, meinen Essener und Aachener Rollenspielern (Benni, Carsten, Daniel, Jeanna, Jens und Maren, Melanie, Mirjam, Nina, Nicole, Peter, Sara und Walter, Sebastian, Tanja sowie Christoph, Jan und Steffi, Joachim, Maja, Stefan und Tobi) und allen anderen Freunden gilt mein Dank, die mir gezeigt haben, dass es auch ein Leben neben der Forschung gibt.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre fortwährende aufbauende Unterstützung und das Gefühl, immer einen sicheren Hafen zu haben.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>GRUNDLAGEN .....</b>	<b>3</b>
2.1	LA-ICP-MS .....	3
2.1.1	Historische Entwicklung der LA-ICP-MS .....	3
2.1.2	Ideales Modell einer Feststoffanalyse mittels Laser-Ablation-ICP-MS.....	5
2.1.3	Der Ablationsprozess.....	7
2.1.3.1	<i>Laser-Feststoff-Wechselwirkung .....</i>	<i>7</i>
2.1.3.1.1	Plasma Shielding .....	8
2.1.3.1.2	Matrixabhängigkeit der Ablation .....	9
2.1.3.1.3	Fraktionierungseffekt durch fraktionierende Verdampfung während der Ablation .....	10
2.1.3.2	<i>Partikelbildung und Partikelgrößenspektrum.....</i>	<i>11</i>
2.1.3.2.1	Primärer Partikelbildungsmechanismus und Einfluss des Trägergases .....	13
2.1.3.2.2	Partikelbildungsmechanismus des Hydrodynamic Sputtering .....	15
2.1.3.2.3	Beitrag des Hydrodynamic Sputtering zur Fraktionierung.....	17
2.1.4	Transport des Aerosols.....	17
2.1.4.1	<i>Partikelgrößenbeschränkung und Fraktionierung durch den Transport.....</i>	<i>18</i>
2.1.4.2	<i>Gasflussrate.....</i>	<i>20</i>
2.1.4.3	<i>Ablationskammerlayout .....</i>	<i>21</i>
2.1.4.4	<i>Schlauchlänge .....</i>	<i>24</i>
2.1.5	Detektion des lasergenerierten Aerosols im ICP-MS .....	25
2.1.5.1	<i>ICP-MS .....</i>	<i>25</i>
2.1.5.2	<i>Verhalten des Ablationsaerosols im Plasma .....</i>	<i>29</i>
2.1.5.3	<i>Molekulare isobare Interferenzen .....</i>	<i>30</i>
2.1.5.4	<i>Anwendbarkeit der Reaktionszellentechnologie.....</i>	<i>31</i>
2.1.5.5	<i>Einfluss der Schussfrequenz auf die Signalform.....</i>	<i>32</i>
2.2	QUANTIFIZIERUNG DER LA-ICP-MS .....	34
2.2.1	Quantifizierung durch das Verfahren der Standardaddition .....	34
2.2.2	Matrixangepasste Kalibration mittels Standardreferenzmaterialien .....	36
2.2.3	Kalibration mittels zerstäubter Standardlösungen .....	37
2.2.4	Nicht matrixangepasste feste Kalibrationsstandards.....	38
2.2.5	Semiquantitative Analyse.....	38
2.2.6	Kalibration durch simultane Analyse gestapelter Proben- und Standardschicht.....	40
2.2.7	Matrixunabhängige Kalibration mittels optimaler Ablationsparameter .....	40
2.2.8	Interne Standardisierung .....	41
2.3	BIOLOGISCHE GEWEBE.....	41
2.3.1	Elemente in Geweben.....	41
2.3.1.1	<i>Vorkommen .....</i>	<i>41</i>
2.3.1.2	<i>Einteilung der Elemente.....</i>	<i>43</i>
2.3.2	Die Leber .....	45
2.4	ZELLENKULTUREN .....	48

2.4.1	Der Zellzyklus .....	48
2.4.2	Die CHO-Zellen.....	51
2.4.3	Platinbasierte Zytostatika und ihre Wirkungen .....	53
2.4.3.1	<i>cis-Platin</i> .....	53
2.4.3.2	<i>Wirkungen und Wirkmechanismus</i> .....	54
2.4.3.3	<i>DNA-Reparatur und Bildung von Chromosomenaberrationen</i> .....	56
<b>3</b>	<b>METHODISCHER TEIL</b> .....	<b>58</b>
3.1	GERÄTE .....	58
3.2	CHEMIKALIEN .....	60
3.3	ELEMENTSTANDARDLÖSUNGEN .....	61
3.4	ZERTIFIZIERTE STANDARDREFERENZMATERIALIEN .....	61
3.5	METHODEN .....	62
3.5.1	Tuning der ICP-MS im trockenen Plasma für die LA-ICP-MS .....	62
3.5.2	Bestimmung des Auswaschverhaltens des Feststoffaerosols aus einer Ablationskammer .....	64
3.5.3	Temperaturmessung in der Kryozelle .....	65
3.5.4	Wassergehalts- und Glühverlustbestimmung .....	66
3.5.5	Bestimmung der CHNS- und O-Gehalte .....	67
3.5.6	Gesamtmetallbestimmung .....	67
3.5.7	Herstellung der Kalibrationsproben für die Standardaddition zur Quantifizierung von Elementkonzentrationen in der Modellmatrix Schweineleber .....	69
3.5.8	Herstellung synthetischer, matrixangepasster Kalibrationsproben basierend auf Polyacrylamid .....	70
3.5.9	Anfertigung von Gewebe- und Kalibrationsgelschnitten .....	72
3.5.10	Methode zur Gewebeuntersuchung mittels LA-ICP-MS .....	73
3.5.11	Kultivierung der CHO-Zellen und deren Aufbringung auf Objektträger .....	74
3.5.11.1	<i>Zellkultur und Zugabe von cis-Platin</i> .....	74
3.5.11.2	<i>Präparation der Meta- und Interphasen</i> .....	75
3.5.11.3	<i>RNAse- und Pepsinbehandlung der Zellen zum RNA- bzw. Proteinverdau</i> .....	75
3.5.11.4	<i>GIEMSA-Färbung der Zellen auf dem Objektträger</i> .....	76
3.5.12	Methode zur Untersuchung einzelner Zellen mittels LA-ICP-MS .....	76
3.5.13	Sequenzielle Untersuchung spezifischer einzelner Zellen mittels optischer Mikroskopie und LA-ICP-MS .....	77
3.5.14	Anfertigung der Kalibrationsgelschnitte zur Kalibration des ICP-MS bei der Untersuchung einzelner Zellen .....	79
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b> .....	<b>81</b>
4.1	OPTIMIERUNGEN DES LA-SYSTEMS .....	81
4.1.1	Einführung von Helium als Ablationsgas .....	81
4.1.2	Verwendung eines neuen Standards zur Einstellung der P/A-Faktoren .....	83
4.1.3	Verkleinerung der Ablationskammer .....	85
4.1.3.1	<i>Aufnahme des orts aufgelösten Auswaschverhaltens des Aerosols aus der Ablationskammer</i> .....	85

4.1.3.1.1	Charakterisierung der Analyseneigenschaften der ursprünglichen Ablationskammer .....	86
4.1.3.1.2	Charakterisierung der Analyseneigenschaften der optimierten Ablationskammer .....	91
4.1.3.1.3	Vergleich des Auswaschverhaltens der beiden Ablationskammereinsätze .....	97
4.1.4	Energiedichtedrift des Lasers .....	98
4.1.5	Das Kryozellensystem .....	100
4.1.5.1	<i>Aufbau des Kryozellensystems .....</i>	<i>100</i>
4.1.5.2	<i>Temperaturen im Inneren der Kryozelle .....</i>	<i>102</i>
4.1.5.3	<i>Verringerung des Kryozellvolumens .....</i>	<i>104</i>
4.1.5.4	<i>Temperaturabhängigkeit der Ablation .....</i>	<i>104</i>
4.2	ORTSAUFGELOSTE ELEMENTKONZENTRATIONSBESTIMMUNG AN GEWEBESCHNITTEN .....	107
4.2.1	Entwicklung der matrixangepassten Standardadditionskalibration anhand der Modellmatrix Schweineleber .....	107
4.2.1.1	<i>Charakterisierung der Matrix .....</i>	<i>107</i>
4.2.1.1.1	<i>Wassergehaltsbestimmung .....</i>	<i>108</i>
4.2.1.1.2	<i>Glühverlustbestimmung .....</i>	<i>109</i>
4.2.1.1.3	<i>CHNSO-Bestimmung von getrockneter Schweineleber .....</i>	<i>109</i>
4.2.1.1.4	<i>Gesamtmetallbestimmung des Lebergewebes .....</i>	<i>110</i>
4.2.1.2	<i>Kalibration mittels Standardadditionsproben .....</i>	<i>113</i>
4.2.1.2.1	<i>Ansatz der Multielementstammlösung zum Ansatz der Standardadditionsproben .....</i>	<i>113</i>
4.2.1.2.2	<i>Qualifizierung der Multielementstammlösung .....</i>	<i>114</i>
4.2.1.2.3	<i>Ansatz der Standardadditionskalibrationsproben .....</i>	<i>116</i>
4.2.1.2.4	<i>Kalibration der LA-ICP-MS mittels Standardaddition zur Bestimmung von Elementkonzentrationen in Schweineleber .....</i>	<i>116</i>
4.2.2	Entwicklung einer synthetischen Matrix zur matrixangepassten, externen Kalibration der LA-ICP-MS zur Bestimmung von Elementkonzentrationen in Gewebeschnitten .....	120
4.2.2.1	<i>Gründe für die Entwicklung einer an die Probenmatrix angepassten synthetischen Matrix .....</i>	<i>120</i>
4.2.2.2	<i>Polyacrylamid als nachahmende, synthetische Matrix .....</i>	<i>121</i>
4.2.2.3	<i>Anpassung des Polyacrylamid-Gels an die nachzuahmende Matrix .....</i>	<i>123</i>
4.2.2.4	<i>Einfluss der PA-Konzentration auf das Analysenergebnis .....</i>	<i>124</i>
4.2.2.5	<i>Herstellung der synthetischen, matrixangepassten Kalibrationsgele zur externen Kalibration der LA-ICP-MS .....</i>	<i>128</i>
4.2.2.6	<i>Elementeintrag durch Gelkomponenten eines ungespikten, synthetischen, matrixangepassten Polyacrylamidgels .....</i>	<i>129</i>
4.2.2.7	<i>Kalibration der LA-ICP-MS mittels synthetischer, matrixangepasster Kalibrationsstandards zur Bestimmung von Elementkonzentrationen in Schweineleber .....</i>	<i>131</i>
4.2.2.8	<i>Nachweisgrenzen des Kalibrationsverfahrens der LA-ICP-MS mittels gespikter, matrixangepasster Polyacrylamid-Gelschnitte .....</i>	<i>134</i>
4.2.2.9	<i>Vergleich der Ergebnisse der LA-ICP-MS nach externer Kalibration mittels matrixangepasster Kalibrationsgele mit den Resultaten des aufgeschlossenen Gewebes sowie Bestimmung der Wiederfindungsraten der Analyten .....</i>	<i>136</i>
4.2.2.10	<i>Vergleich der matrixangepassten, externen Kalibration mit der Standardadditionstechnik .....</i>	<i>138</i>
4.3	UNTERSUCHUNG EINZELNER ZELLEN MITTELS LA-ICP-MS .....	143
4.3.1	Entwicklung einer Untersuchungsmethode zur gezielten Analyse einzelner Zellen einer Zellkultur auf einem Objektträger .....	143



4.3.2	Entwicklung von Kalibrationstechniken zur Elementkonzentrationsbestimmung in einzelnen Zellen.....	147
4.3.2.1	<i>Kalibrationstechnik mittels Ablation von aufgetropften Standards .....</i>	148
4.3.2.2	<i>Kalibrationstechnik mittels synthetischer, matrixangepasster Standards .....</i>	152
4.3.2.3	<i>Vergleich der beiden Kalibrationsmethoden.....</i>	156
4.3.2.3.1	Vergleich der analytischen Eckdaten beider Methoden .....	156
4.3.2.3.2	Überprüfung der Richtigkeit der Kalibration der beiden Methoden .....	157
4.3.3	Untersuchung von cis-Platin inkubierten CHO-Zellen mittels LA-ICP-MS .....	161
4.3.3.1	<i>Bestimmung des Phosphor- und Platingehalts cis-Platin behandelter CHO-Zellen .....</i>	162
4.3.3.2	<i>Untersuchung des Bindungs- und Aufnahmeverhaltens von cis-Platin in CHO-Zellen.....</i>	163
4.3.3.3	<i>Sequenzielle Untersuchung von Metaphasen in CHO-Zellen mittels optischer Mikroskopie und LA-ICP-MS .....</i>	167
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>173</b>
<b>6</b>	<b>AUSBLICK.....</b>	<b>177</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>179</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>198</b>
<b>9</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>201</b>
<b>10</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>209</b>
<b>11</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>213</b>
11.1	UNTERSUCHUNGEN ZUM KRYOZELLENSYSTEM.....	213
11.2	ZUR GESAMTMETALLBESTIMMUNG DES LEBERGEWEBES: UNTERSUCHUNG DES SRM 2976 .....	215
11.3	KALIBRATIONSGERADEN DER LA-ICP-MS MITTELS STANDARDADDITION ZUR BESTIMMUNG VON ELEMENTKONZENTRATIONEN IN SCHWEINELEBER .....	216
11.4	EINFLUSS DER PA-KONZENTRATION AUF DAS ANALYSENERGEBNIS .....	219
11.5	ZUM ANSATZ DER SYNTHETISCHEN, MATRIXANGEPASSTEN KALIBRATIONSGELSCHNITTE .....	221
11.6	KALIBRATIONSGERADEN DER LA-ICP-MS DURCH DIE KALIBRATION MITTELS GESPIKTER, SYNTHETISCHER MATRIXANGEPASSTER POLYACRYLAMID-GELSCHNITTE .....	224
11.7	BERECHNUNG DER MASSE AN DNA UND DES DARAUS RESULTIERENDEN PHOSPHORGEHALTS EINER DURCHSCHNITTlichen, NICHT SYNCHRONISIERTEN CHO-INTERPHASE-ZELLE UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DER LÄNGE DER PHASEN DES ZELLZYKLUS.....	227
11.8	ABSCHÄTZUNG DES PHOSPHORGEHALTS DER ZELLMEMBRAN EINER CHO-ZELLE.....	228
<b>12</b>	<b>PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>230</b>

# 1 Einleitung

Die bioanorganische Spurenanalytik ist heutzutage ein schnell wachsendes Forschungsgebiet. Immer mehr werden die Funktionsmechanismen von Biomolekülen verstanden und die Bedeutung der oft in ihnen komplexierten Metallionen offenbart<sup>[1]</sup>. Auch gibt es eine Menge metabolischer Studien, die die Wirkung und Eliminationswege von anorganischen Schadstoffen und ihrer Metabolite untersuchen<sup>[2-5]</sup>. Ebenso weisen bestimmte neurodegenerative Krankheitsbilder, wie beispielsweise Creutzfeldt-Jakob, Alzheimersche oder Parkinsonsche Krankheit, Abweichungen im Gehalt bestimmter Elemente im betroffenen Gewebe auf<sup>[6]</sup>, so dass diese in den Fokus der bioanorganischen Analytik gerückt werden. Die Untersuchung der Effekte von Platin basierten Zytostatika (wie cis-Platin, Carbo-Platin oder Oxali-Platin) auf Gewebe gehört ebenfalls in dieses Gebiet<sup>[7]</sup>.

Seit langem sind bereits Methoden bekannt Gewebe ortsabhängig auf bestimmte Elemente hin zu untersuchen. Diese Techniken sind jedoch meist auf Farbstoffen basierend und können im besten Fall relative Aussagen treffen. Auch sind sie meist wenig sensitiv, verfügen nur über einen geringen dynamischen Bereich und liefern Ergebnisse mit einer hohen Ungenauigkeit, so dass geringe Schwankungen im Elementgehalt gar nicht erst erfasst werden<sup>[8]</sup>.

Durch den Einsatz einer elementsensitiven, massenspektrometrischen Methode wie der LA-ICP-MS ist es möglich, die Nachteile der Färbetechniken auszugleichen. Sie ist ein empfindlicher Detektor mit einem örtlichen Auflösungsvermögen im  $\mu\text{m}$ -Bereich und liefert einen großen dynamischen Bereich von den Hauptbestandteilen bis in den Spurenbereich mit Nachweisgrenzen im unteren  $\mu\text{g/g}$ -Bereich.

Das große Problem der LA-ICP-MS liegt jedoch in der hohen Matrixabhängigkeit des Ablationsprozesses, so dass bis jetzt eine Vielzahl von Kalibrationsstrategien erprobt wurden. Alle dieser Strategien haben jedoch ihrerseits Nachteile und sind meist recht kompliziert, so dass sich noch keine Strategie als überlegen durchsetzen konnte<sup>[9]</sup>.

Daher ist es ein Ziel dieser Arbeit, einen neuen Kalibrationsansatz der LA-ICP-MS für die orts aufgelöste Untersuchung von Elementgehalten in Gewebeschnitten zu entwickeln. Diese valide Technik soll einfach in der Herstellung der Standards und in der Anwendung sein. Außerdem soll sie über eine möglichst universelle Anwendbarkeit auf sämtliche Gewebeschnitte verfügen. Die erzeugten

Kalibrationsstandards sollen homogen sowie stabil sein, über einen großen Konzentrationsbereich anwendbar sein und eine Multielementanalyse ermöglichen.

Neben Gewebeproben werden vor allem Zellkulturen zur Erforschung diverser biologischer Fragestellungen verwendet. Fibroblastenzelllinien aus den Ovarien chinesischer Hamster (CHO-Zellen) sind ein etabliertes System für derartige Zellkultursysteme<sup>[10-13]</sup>. Unter anderem wird an ihnen an einem umfassenden Verständnis der Effekte und Wirkungen von elementbasierten Zytostatika geforscht<sup>[14-16]</sup>.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es daher die neue Anwendung der LA-ICP-MS auf Zellkulturen durch die Untersuchung einzelner Zellen zu zeigen. Dies wird nach der Entwicklung eines Quantifizierungsverfahrens direkt anhand einer konkreten Fragestellung aus dem Bereich der Genetik demonstriert. Speziell sollen CHO-Zellen mit dem Zytostatikum cis-Platin inkubiert werden und mittels LA-ICP-MS quantitativ untersucht werden, wie viel des Zytostatikums aufgenommen wird und wie groß seine Mutagenität (Erzeugung von Chromosomenabberationen) in Abhängigkeit von der aufgenommenen Dosis ist.

## 2 Grundlagen

### 2.1 LA-ICP-MS

#### 2.1.1 Historische Entwicklung der LA-ICP-MS

Nachdem im Jahr 1981 von Thompson bereits eine Kopplung eines induktiv gekoppelten Plasma-Atomemissionspektrometers (ICP-AES) mit einer Laser-Ablationsapparatur vorgestellt wurde<sup>[17]</sup>, gelang es 1985 Alan Gray als Erstem, ein induktiv gekoppeltes Plasma-Massenspektrometer (ICP-MS) mit dieser neuen Form der Probenzuführung auszurüsten<sup>[18]</sup> und auf diese Weise von den besseren analytischen Leistungsdaten der ICP-MS gegenüber der ICP-AES zu profitieren. Seitdem hat diese Methode eine weite Verbreitung bei qualitativen und quantitativen Analysen der Elementzusammensetzung sowie der Bestimmung von Isotopenverhältnissen verschiedenster Feststoffe gewonnen<sup>[19-22]</sup>. Ein großes Anwendungsgebiet ist die Analyse von geologischen Proben, wie zum Beispiel Gesteinen, Meteoriten und insbesondere deren Einschlüssen<sup>[23,24]</sup>. Dies ist möglich, da mittels Laser-Ablation selbst Strukturen von nur wenigen Mikrometern Durchmesser untersucht werden können.

Da es sich um ein minimal destruktives Verfahren handelt, finden sich weitere Anwendungsgebiete in der Forensik<sup>[25,26]</sup> sowie der Untersuchung archäologischer Proben<sup>[27,28]</sup>.

In letzter Zeit findet die LA-ICP-MS auch eine gehäufte Anwendung auf biologische und medizinische Fragestellungen<sup>[29-31]</sup>, wie beispielsweise die Anwendung der LA-ICP-MS auf Gele nach erfolgter Gelelektrophorese zur Untersuchung von Metallproteinen im Blutserum<sup>[32]</sup>.

Die Vorteile gegenüber einer Analyse mittels ICP-MS mit Flüssigaufgabe bestehen unter anderem in einer wesentlich geringeren benötigten Probenmenge. Die Probenaufnahmegeschwindigkeit liegt üblicherweise zwischen 0,0001 bis 0,1 µg/s<sup>[33]</sup>, so dass theoretisch bei homogenen Proben schon eine Probegröße von einem Sandkorn ausreicht.

Desweiteren benötigt die Laser-Ablation nur eine minimale Probenvorbereitung, die das Risiko einer Kontamination mit Fremdstoffen durch verwendete Solventien, das

in der Spurenanalytik immer besteht, stark minimiert <sup>[34]</sup>. Auf diese Weise können zum Beispiel fast jegliche Feststoffe durch Laser-Ablation ohne weitere Aufschlüsse direkt dem Analysator zugeführt werden.

Ein weiterer Vorteil besteht in der Möglichkeit, die Analyse orts aufgelöst durchzuführen, so dass bei inhomogenen Proben auch orts aufgelöste Informationen über den Elementgehalt geliefert werden können, welche bei einem Aufschluss verlorengehen.

Durch Kopplung mit einem ICP-MS als Detektor macht sich die Laser-Ablation deren extrem hohe Sensitivität und den großen Bereich der Detektorlinearität<sup>[33,35]</sup> zu nutze. Auf diese Weise können trotz ablierter Probenmengen im unteren µg-Bereich Nachweisgrenzen für viele Elemente im oberen ng/g-Bereich erreicht werden<sup>[34]</sup>.

Diese noch relativ junge Analysentechnik ist den Kinderschuhen jedoch noch nicht vollständig entwachsen und der Prozess der Laser-Ablation noch nicht in Gänze verstanden. Neben diversen Anwendungsmöglichkeiten wurden in den Jahren seit der Einführung der LA-ICP-MS 1985 ihre theoretischen Grundlagen mit steigendem Tempo erforscht.

Bis ca. 1994 wurden zunächst vorwiegend grundlegende Faktoren wie beispielsweise der Einfluss der Schlauchlänge auf die Signalform<sup>[36]</sup> oder die Abhängigkeit der ablierten Masse von der Laserwellenlänge<sup>[37]</sup> untersucht. 1995 wurde dann der Fraktionierungseffekt der Ablation entdeckt<sup>[38]</sup> und in den folgenden Jahren die daraus erwachsenden Folgen erforscht<sup>[39-41]</sup>. Es folgten Untersuchungen wichtiger Größen wie zum Beispiel des Partikelgrößenspektrums<sup>[42-44]</sup> sowie weiterer an der Analyse beteiligter Parameter (Pulsdauer<sup>[45-47]</sup>, Ablationskammerlayout <sup>[48,49]</sup>, usw.) In den letzten Jahren werden zunehmend öfter Simulationen veröffentlicht<sup>[49-54]</sup>, die darauf hindeuten, dass der Prozess der Laser-Ablation langsam in der nötigen Tiefe verstanden wird, um immer mehr Klippen der Methode umschiffen zu können. Noch ist dieser Lernprozess jedoch noch nicht abgeschlossen und wird wohl noch weitere Jahre in Anspruch nehmen.

## 2.1.2 Ideales Modell einer Feststoffanalyse mittels Laser-Ablation-ICP-MS

Die Analyse einer festen Probe mittels LA-ICP-MS kann in drei Phasen unterteilt werden, die seit der Einführung der Analysenmethode einem fortwährenden Optimierungsprozess unterliegen.

Diese Phasen sind:

- Ablationsprozess inkl. Aerosolbildung
- Aerosoltransport
- Aufschluss der Aerosolpartikel im Plasma

Ein idealisiertes Modell<sup>[55]</sup> der LA-ICP-MS lässt sich wie folgt beschreiben (siehe auch Abb. 1):

In der ersten Phase verdampft ein auf die Probe gerichteter Laserpuls örtlich scharf umrissen eine Masse an Probensubstanz. Die verdampfte Masse bildet mit der Gasphase, dem sog. Trägergas, ein feines Feststoffaerosol, dessen Partikel stöchiometrisch exakt mit der Probenzusammensetzung übereinstimmen. Die restliche Probe bleibt chemisch und physikalisch unverändert und es schlägt sich kein Aerosol aus der Gasphase auf der Probe nieder.

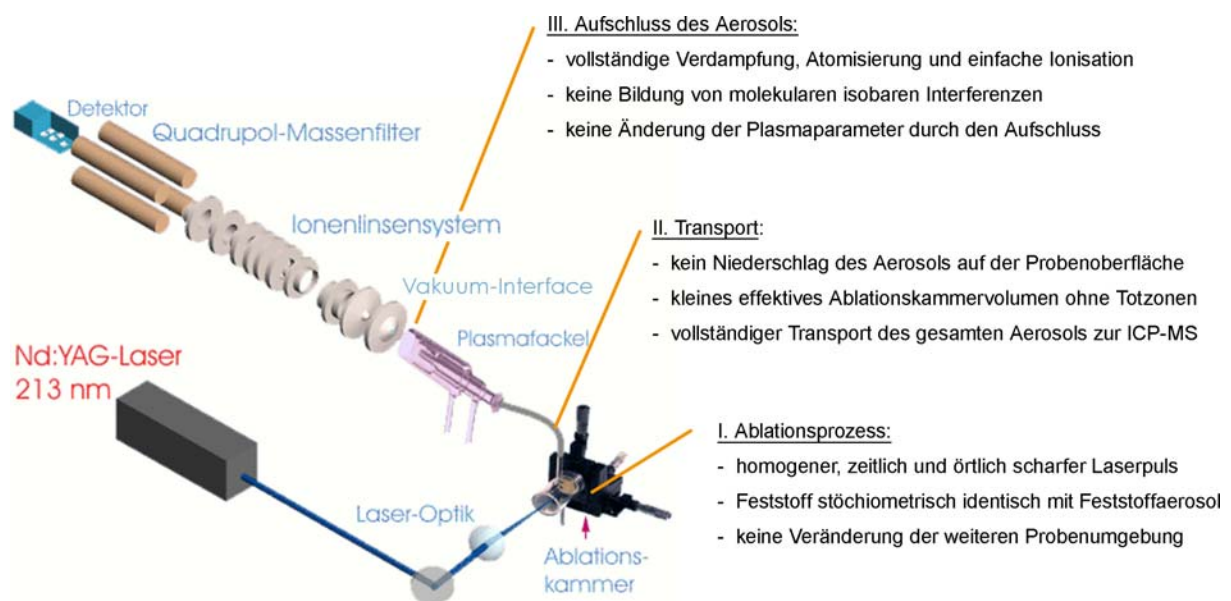


Abb. 1: Schema der idealen LA-ICP-MS

In der zweiten Phase findet ein verlustfreier Transport der Aerosolpartikel vom Ort der Ablation, über die Ablationskammer, durch den Schlauch und die Plasmafackel des ICP-MS bis in dessen Plasma statt. Es gibt keine Totzonen jedoch ein möglichst kleines effektives Gesamtvolumen, so dass es zu scharfen Elementsignalen ohne Auswascheffekte des Aerosols aus der Ablationskammer kommt.

In der letzten Phase werden die Aerosolpartikel vollständig im Plasma aufgeschlossen, verdampft, atomisiert und einfach ionisiert, ohne das Plasma an sich zu verändern oder isobare molekulare Interferenzen hervorzurufen.

Dieses idealisierte Modell der LA-ICP-MS entspricht nicht den Bedingungen in der Realität. Um dennoch möglichst nahe an diese heranzukommen, ist ein tiefgehendes Verständnis des gesamten Analysesystems und dessen Zusammenspiel mit dem Probenmaterial unerlässlich.

Für eine Optimierung des LA-ICP-MS-Systems auf eine bestimmte Anwendung sind folgende Voraussetzungen nötig<sup>[55]</sup>:

- Informationen über die Hauptbestandteile der Probenmatrix, über deren Morphologie bzw. Homogenität
- Kenntnisse über die Wechselwirkung von Laserlicht mit Materie und über den Ablationsprozess
- Wissen um den Aerosolbildungsprozess und die örtliche Verteilung der Partikel in der Ablationskammer, jeweils in Abhängigkeit zur verwendeten Energiedichte, Laser-Wellenlänge und Ablationsgas
- Wahl der besten Ablationskammer und Aerosolüberföhrungslösung für die jeweilige Anwendung (Einzelpunkt-Analyse, scannende Flächenanalyse, Tiefenprofilmessung)
- Informationen über die Partikelgrößenverteilung der jeweiligen Matrix
- Wissen über die Atomisierungsfähigkeiten des verwendeten ICP-MS in Abhängigkeit zur Partikelgröße

### 2.1.3 Der Ablationsprozess

Der Begriff „Ablation“ stammt vom Lateinischen „ablare“ ab, und kann mit dem Begriff „Abtragung“ übersetzt werden. Als Laser-Ablation wird daher der Vorgang der Abtragung von Materie bezeichnet, der durch einen hochenergetischen Laserpuls, der auf eine Feststoffoberfläche trifft, hervorgerufen wird.

Es lassen sich zwei Effekte unterscheiden, die zu einem Abtrag des Feststoffs führen:

An erster Stelle steht die reine Wechselwirkung der Laserstrahlung mit der Feststoffoberfläche. Daneben finden allerdings auch noch Sekundärprozesse statt, die zur Mobilisierung der festen Phase führen und somit Einfluss auf die Zusammensetzung des Feststoffaerosols haben. Ähnlich wie bei einer winzigen Explosion werden sowohl feste wie auch geschmolzene Oberflächenpartikel hoch geschleudert (engl.: hydrodynamic sputtering), welche im Trägergas zum ICP-MS gelangen und somit zum Analyseergebnis beitragen<sup>[56,57]</sup>.

#### 2.1.3.1 Laser-Feststoff-Wechselwirkung

Die Wechselwirkung zwischen Laserpuls und fester Probenmatrix lässt sich grundlegend mit der Absorption und daraus resultierenden Effekten erklären. Sie ist stark von der Leistungsdichte ( $\text{W}/\text{cm}^2$ ) des auf die Feststoffoberfläche gelangenden Laserlichts, der sog. Fluenz,<sup>[58]</sup> und der Pulsdauer abhängig<sup>[59]</sup>.

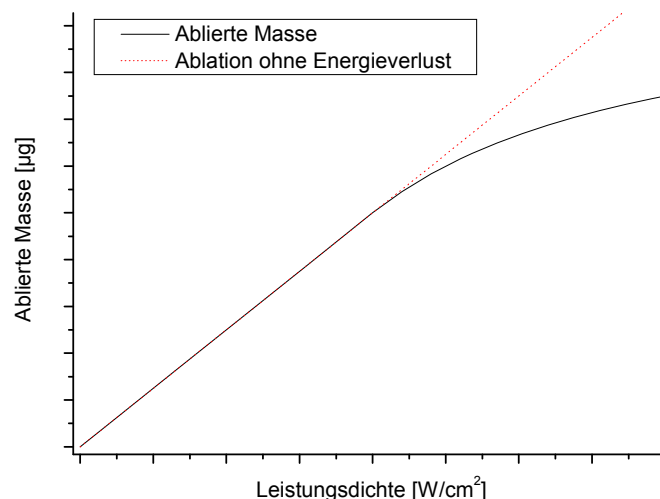
Bei Lasern mit Pulsdauern über einer Nanosekunde - wie in dieser Arbeit verwendet - lässt sich der Ablationsprozess am besten mit einem auf schneller Erwärmung, Schmelzen und Verdampfung basierenden Modell<sup>[60]</sup> beschreiben<sup>[61]</sup>.

Eine Verdampfung von Materie und damit Laser-Ablation lässt sich abhängig vom Feststoff ab einer Fluenz von ca.  $10^3 \text{ W}/\text{cm}^2$  beobachten<sup>[58]</sup>, wobei die typischen Leistungsdichten in der Anwendung der Laser-Ablation im Bereich von  $10^4$  bis  $10^{10} \text{ W}/\text{cm}^2$  liegen<sup>[60]</sup>. Bei geringen Leistungsdichten von ungefähr  $10^6 \text{ W}/\text{cm}^2$  ist der entstehende Dampf noch sehr dünn und für den Laser im Wesentlichen transparent. Mit steigender Fluenz wird der Dampf jedoch zunehmend übersättigt, was nach der Expansion und dem damit verbundenen starken Abkühlen des Dampfs in der Kondensation von Partikeln im Submikrometerbereich mündet<sup>[53]</sup>.



Bei hoher Schussfrequenz kann es durch die noch über dem Feststoff schwebenden Partikel des vorangegangenen Schusses zu Streuungseffekten und je nach Partikelgröße und Laserwellenlänge zu Absorption kommen<sup>[58]</sup>, so dass nicht mehr die volle Laserleistung auf die Feststoffoberfläche gelangt. Darüber hinaus hat der entstehende Dampf einen anderen Brechungsindex als das Trägergas, was zu einer Defokussierung des Lasers führen kann<sup>[58]</sup>.

Ab einer Fluenz von ungefähr  $10^7$  bis  $10^{10}$  W/cm<sup>2</sup> - abhängig von Feststoff und Laserwellenlänge - wird der Dampf teilweise ionisiert. Dies führt zu einer vermehrten Eigenabsorption des Dampfes und geringerer Energieübertragung auf die Feststoffoberfläche<sup>[58,61,62]</sup>, der sog. Plasmaabschirmung (engl.: plasma shielding; vgl. Abb. 2Abb. 2).



**Abb. 2:** Leistungsdichte eingebrachter Energie gegen ablierte Masse

Die Gesamtmenge an Feststoff, die pro Puls abliert wird, steigt ab der Bestrahlung mit der Schwellenfluenz zunächst linear an<sup>[63]</sup>, flacht aber bei hohen Fluenzen mit dem Aufkommen von Energieverlusten durch Dampf- und Partikelabsorption und Plasma Shielding ab.

#### **2.1.3.1.1 Plasma Shielding**

Der Effekt des Plasma Shieldings ist neben der Fluenz stark von der Wellenlänge des verwendeten Lasers abhängig. Über den sichtbaren Bereich hin zum

Ultravioletten (UV) wird er geringer, während er bei IR-Lasern je nach Matrix so stark ausgeprägt sein kann, dass die auf die Oberfläche gelangende Energie hierdurch asymptotisch beschränkt ist<sup>[58]</sup>.

Da die bei starkem Plasma Shielding gebildeten Wolken ionisierter Materie sehr unregelmäßig geformt sind, führt dies zu einer sehr ungleichmäßigen Ablationsrate. Dies wiederum schlägt sich bei der Analyse in einer hohen Standardabweichung nieder<sup>[64]</sup>.

Desweiteren führt starkes Plasma Shielding dazu, dass die Feststoffoberfläche um den eigentlichen Ablationsort herum physikalisch wie auch chemisch lokal einer Veränderung unterliegt und so das laterale Auflösungsvermögen der LA-ICP-MS herabsetzt<sup>[37]</sup>.

Da Plasma Shielding mit kürzer werdenden Wellenlängen abnimmt, hat sich in der modernen LA-ICP-MS-Analytik die Verwendung von UV-Lasern (266 nm, 213 nm, 193 nm, 157 nm)<sup>[41,65]</sup> durchgesetzt.

Ebenfalls wurde beobachtet, dass die Art des Trägergases einen Einfluss auf die Ausbildung eines Plasmas bei der Ablation hat. Im Vergleich der Gase Helium und Argon hat sich gezeigt, dass sich in Helium ein deutlich kleineres Plasma ausbildet<sup>[44]</sup>. Erklärbar ist dies durch die schnellere Abführung der Energie aus dem Plasma durch seine fast um eine Größenordnung höhere Wärmeleitfähigkeit<sup>[66]</sup>. Dies hat zur Folge, dass es in Helium verglichen mit Argon auch nur zu wesentlich weniger Plasma Shielding kommt.

### **2.1.3.1.2 Matrixabhängigkeit der Ablation**

Ein weiterer Vorteil kürzerer Wellenlängen ist neben der Reduktion des Plasma Shieldings die Abnahme der Matrixabhängigkeit der Ablation<sup>[37,65]</sup>. Erklären lässt sich dies zum einen durch eine geringere Reflektivität der Probenoberfläche<sup>[67]</sup>. Dies führt zu einer höheren Energieausbeute des Laserpulses für den Ablationsprozess<sup>[50]</sup>. Zum anderen nimmt die Absorption im UV-Bereich im Allgemeinen zu kürzeren Wellenlängen stark zu<sup>[68,69]</sup>. Dies hat zur Folge, dass die Eindringtiefe der Laserstrahlung in die Probenmatrix abnimmt<sup>[65]</sup>, so dass pro Volumen eine größere Energie bei der Ablation auf die Probe übertragen wird. Daher wird hin zu kürzeren Wellenlängen auch eine Abnahme des Schwellenfluenzwertes beobachtet, der für eine Induktion der Ablation benötigt wird<sup>[41]</sup>.

### **2.1.3.1.3 Fraktionierungseffekt durch fraktionierende Verdampfung während der Ablation**

Mit Hilfe des oben in Kapitel 2.1.3.1 (S. 7) beschriebenen auf einem schnellen Erwärmungs-, Schmelz- und Verdampfungsvorgang basierenden Modells des Ablationsprozesses lässt sich der in der Praxis auftretende Unterschied in der stöchiometrischen Elementzusammensetzung des Feststoffs gegenüber den Aerosolpartikeln erklären. Aus den Beobachtungen geht eine Anreicherung schneller flüchtige Stoffe im Aerosol gegenüber dem Feststoff hervor. Da dies auf einen fraktionierenden Verdampfungsvorgang zurückgeführt werden kann, wird dieser Effekt Fraktionierungseffekt genannt<sup>[38]</sup>.

Es gibt allerdings noch zwei weitere Effekte, die in der Literatur ebenfalls unter den Begriff des Fraktionierungseffekts fallen. Sie sind mit dem Transport des Feststoffaerosols und dem Aufschluss der Partikel im induktiv gekoppelten Plasma des ICP-MS verknüpft und werden an diesen Stellen (Kapitel 2.1.4.1, S. 18 bzw. Kapitel 2.1.5.2, S. 29) separat beschrieben.

Der Fraktionierungseffekt des Ablationsprozesses ist wie die Matrixabhängigkeit stark von der verwendeten Laserwellenlänge aber auch von dessen Pulsdauer abhängig<sup>[70]</sup>.

Je kürzer die Wellenlänge desto geringer ist auf Grund höherer Absorption wie bereits beschrieben (Kapitel 2.1.3.1.2, S. 9) die Eindringtiefe der Strahlung in die Oberfläche<sup>[65,69]</sup>. Bei konstanter Energiedichte ( $\text{J}/\text{cm}^2$ ) ergibt sich somit ein geringeres bestrahltes Volumen und damit eine höhere Volumenenergiedichte ( $\text{J}/\text{cm}^3$ ) sowie letztendlich eine höhere Temperatur. Zusätzlich wird bei kürzeren Pulsdauern und konstanter Energiedichte die Energie in kürzerer Zeit übertragen. Beide Faktoren führen zu einer Erhöhung der Leistungsdichte im bestrahlten Volumen ( $\text{J}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{cm}^{-3}$ ). Das hat zur Folge, dass sich bei der Ablation lokal stark begrenzt eine sehr hohe Temperatur ergibt und der Verdampfungsprozess schneller erfolgt, als dass sich ein Verdampfungsgleichgewicht ausbilden kann und sich somit ein geringerer Fraktionierungseffekt ergibt<sup>[53,57]</sup>.

Eine physikalische Eigenschaft der Probe, die sich in einer erhöhten Fraktionierung niederschlägt, ist ein hoher Wärmeleitkoeffizient<sup>[53]</sup>. Dieser führt insbesondere bei längeren Pulsen (ns-Bereich) zu einem erhöhten Verlust an für die Ablation zu Verfügung stehender Energie und zur Erwärmung des benachbarten, nicht mehr ablierten Probenmaterials, so dass es zur Ausbildung eines

Verdampfungsgleichgewichts kommen kann und eine fraktionierende Verdampfung stattfindet.

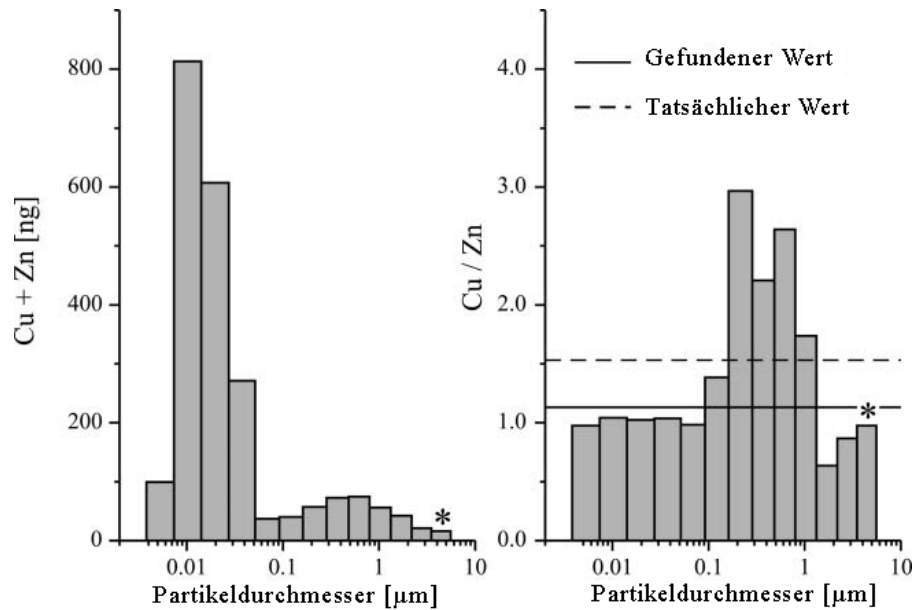
Metalle besitzen im Allgemeinen einen hohen Wärmeleitkoeffizienten. Deshalb ist bei Metallen und Legierungen gegenüber anderen Feststoffen (wie zum Beispiel Glas) der Fraktionierungseffekt besonders stark ausgeprägt<sup>[71]</sup>.

Gestützt wird dieses Modell ebenfalls durch den Vergleich der Ablation mit Laserpulsdauern im fs-Bereich. Hierbei liegt die Einwirkungszeit des Lasers im Bereich der Molekülschwingungen<sup>[72]</sup> und unter der thermischen Relaxationszeit<sup>[73]</sup>, so dass weder Wärmeleitung noch Ausbildung eines Verdampfungsgleichgewichts vor der eigentlichen Ablation stattfinden können. Dies hat zur Folge, dass nur ein sehr kleiner Fraktionierungseffekt auftritt<sup>[45,69]</sup>.

### **2.1.3.2 Partikelbildung und Partikelgrößenspektrum**

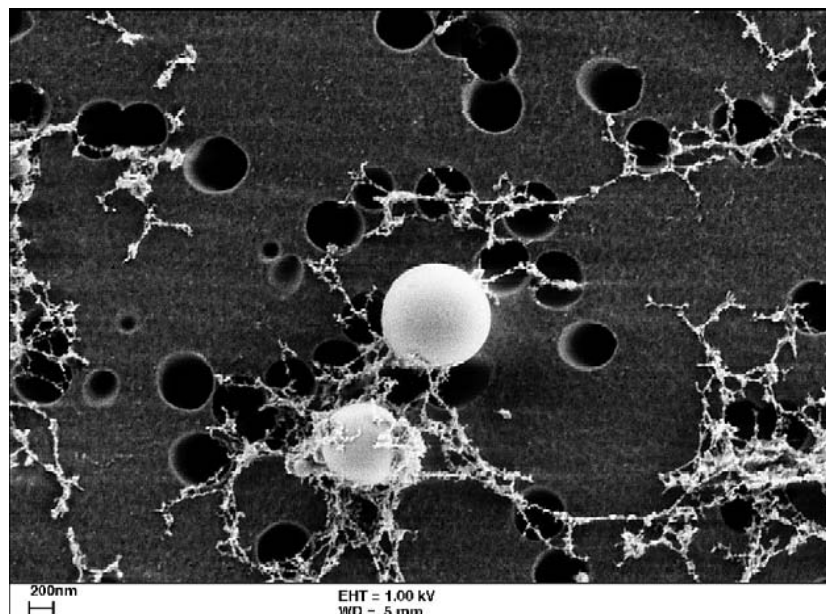
Das Partikelgrößenspektrum eines mittels Laser-Ablation erzeugten Feststoffaerosols liegt im Allgemeinen zwischen einigen Hundert Pikometern und wenigen Mikrometern<sup>[59,74]</sup>. Es zeigt typischerweise zwei Maxima, die auf das Vorhandensein von mindestens zwei Partikelbildungsmechanismen schließen lassen. Beide Fraktionen können sich stark in ihrer chemischen Zusammensetzung voneinander unterscheiden wie das folgende Beispiel<sup>[59]</sup> zeigt:

Bei der Untersuchung von Messing (Cu/Zn 1,53:1) mittels Laser-Ablation (Laser: 775 nm, 5 ns Pulsdauer) ist in der Fraktion bis 100 nm zu beobachten, dass sich das leichter flüchtige Zink (Siedepunkt 1180 K) gegenüber Kupfer (Siedepunkt 2840 K) deutlich anreichert, während es in den Größenfraktionen über 100 nm genau umgekehrt der Fall ist (Abb. 3 rechts, S.12).



**Abb. 3:** Partikelgrößenspektrum (links) und chemische Zusammensetzung der einzelnen Massenfraktionen (rechts) bei der Ablation von Messing mittels 775 nm Titan-Saphir-Laser (Pulsdauer 5 ns)<sup>[59]</sup>

Mikroskopische Aufnahmen<sup>[75]</sup> gefilterter Partikel bestätigen ebenfalls den Verdacht, dass mindestens zwei unabhängige Partikelbildungsmechanismen existieren, da zwei Klassen von Partikeln auftreten: faserförmige Agglomerate und große sphärische Partikel<sup>[76]</sup> (Abb. 4).



**Abb. 4:** Zwei Teilchenklassen (Fasern und sphärische Partikel) an gefilterten Aerosolpartikeln des Standardreferenzmaterials NIST 610 auf einer Filtermembran<sup>[77]</sup>

### **2.1.3.2.1 Primärer Partikelbildungsmechanismus und Einfluss des Trägergases**

Der bei der Ablation erzeugte 1000 bis 10000 °C<sup>[78]</sup> heiße Probendampf expandiert in das Umgebungsgas und kühlt dabei durch die Expansion an sich sowie durch die Wechselwirkung mit dem Ablationsgas stark ab. Der Dampf übersättigt und das verdampfte Probenmaterial fällt aus der Gasphase in Form von feinen Partikeln aus und bildet ein Feststoffaerosol<sup>[52]</sup>.

Das Spektrum der Partikelgrößen, das durch diesen Mechanismus erzeugt wird, die Partikelform und ihre Zusammensetzung hängen stark vom Umgebungsdruck sowie der Art des Umgebungsgases und des Probenmaterials ab.

Die Ablation bei einer Analyse mittels LA-ICP-MS findet bei Umgebungsdruck statt, das heißt, die Expansion des verdampften Probenmaterials findet in das sog. Ablationsgas statt.

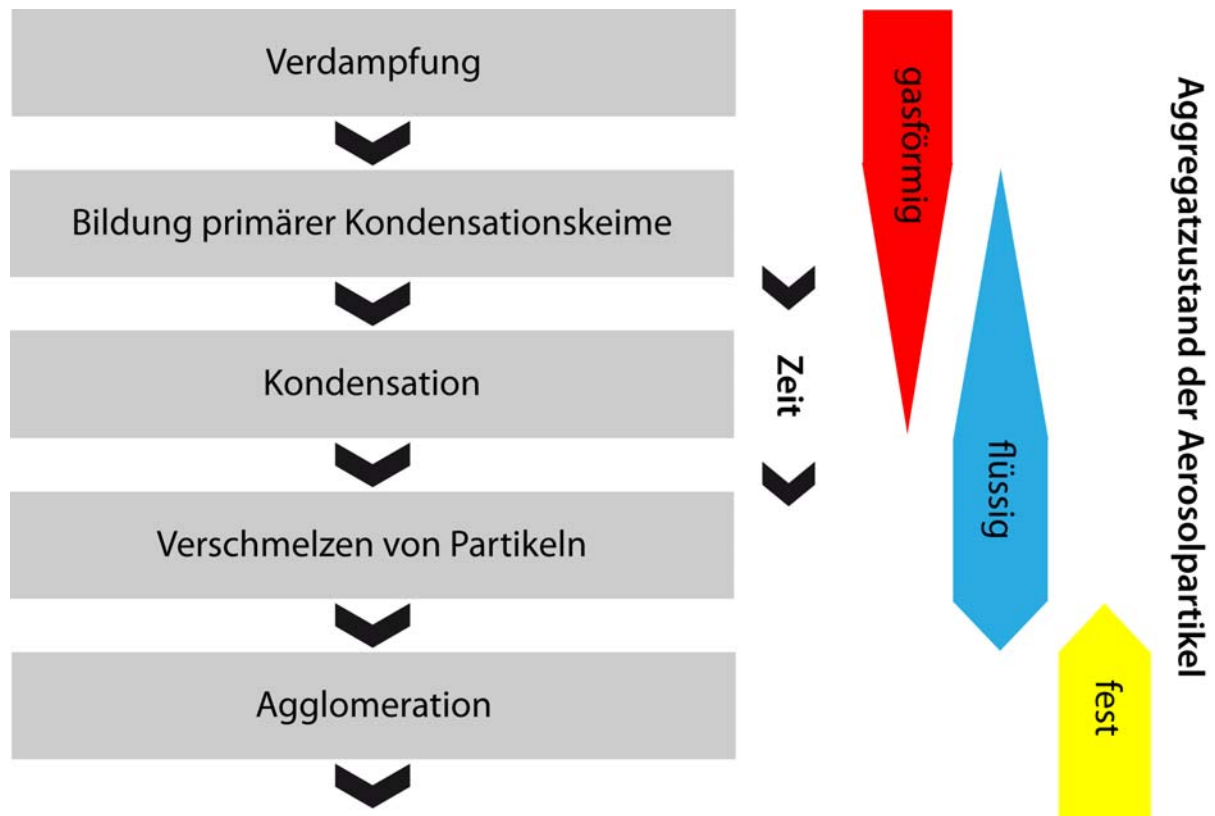
In frühen Studien zur LA-ICP-MS wurde hierfür im Allgemeinen Argon benutzt, da es sich bei dem induktiv gekoppelten Plasma des ICP-MS um ein Argonplasma handelt und somit eine optimale Kompatibilität gegeben ist. Heutzutage verwendet man in der Regel Helium als Ablationsgas, dem nach der Ablationskammer und unmittelbar vor dem ICP-MS über ein Y-Stück Argon hinzugeführt wird, um die Atomisierung und die Ionisation des Feststoffaerosols im Argonplasma zu gewährleisten.

Die Verwendung von Helium als Ablationsgas statt Argon führt zu einer Sensitivitätssteigerung um einen Faktor von zwei bis vier<sup>[39]</sup>. Der Grund hierfür liegt im wesentlich feineren Partikelgrößenspektrum, dass bei der Ablation mit Helium entsteht. So scheidet sich wesentlich weniger Material aus der Gasphase ab<sup>[79]</sup> und eine bessere Atomisierung sowie Ionisation im Argonplasma des ICP-MS wird erreicht<sup>[44]</sup>.

Die Ursache für die feinere Partikelgrößenverteilung ist in der besseren Wärmeleitfähigkeit von Helium gegenüber Argon begründet<sup>[66]</sup>. Der bei der Ablation entstehende Dampf expandiert und wird durch das Ablationsgas zunehmend abgekühlt, bis der Dampf übersättigt und eine Kondensation initialisiert wird.

An diese primären, wenige Nanometer großen Kondensationskeime<sup>[52]</sup> lagert sich weiteres Material, bis die Partikel durch weitere Abkühlung erstarren (vgl. Abb. 5).

Bei Ablationsgasen mit hoher Wärmeleitfähigkeit wie zum Beispiel Helium geschieht dies schneller als bei Gasen mit niedrigerer Wärmeleitung. Deshalb fällt die Phase des kondensationsbedingten Partikelwachstums für Helium kürzer aus als für Argon<sup>[52]</sup>.



**Abb. 5:** Schematische Darstellung des primären Partikelbildungsmechanismus bis zur Bildung von Agglomeraten

Dieser Partikelbildungsmechanismus kann Partikelgrößen bis ca. 100 nm erklären<sup>[60]</sup>. Er ist von der verwendeten Laserwellenlänge weitgehend unabhängig. Das beobachtete Partikelgrößenspektrum geht allerdings noch weit über 100 nm hinaus bis etwa 10  $\mu\text{m}$ <sup>[59,74]</sup>. Für diese größeren Partikel gibt es mehrere Ursachen: Zum einen agglomerieren die primären erstarrten Kondensationspartikel durch Kollision miteinander zu faserförmigen Teilchen<sup>[76]</sup>, wobei die Initialpartikelgrößenverteilung innerhalb eines solchen Teilchens erhalten bleibt<sup>[80]</sup>. Zum anderen lässt sich eine Klasse großer sphärischer Partikel beobachten, der ein anderer Bildungsmechanismus zu Grunde liegen muss.

### **2.1.3.2.2 Partikelbildungsmechanismus des Hydrodynamic Sputtering**

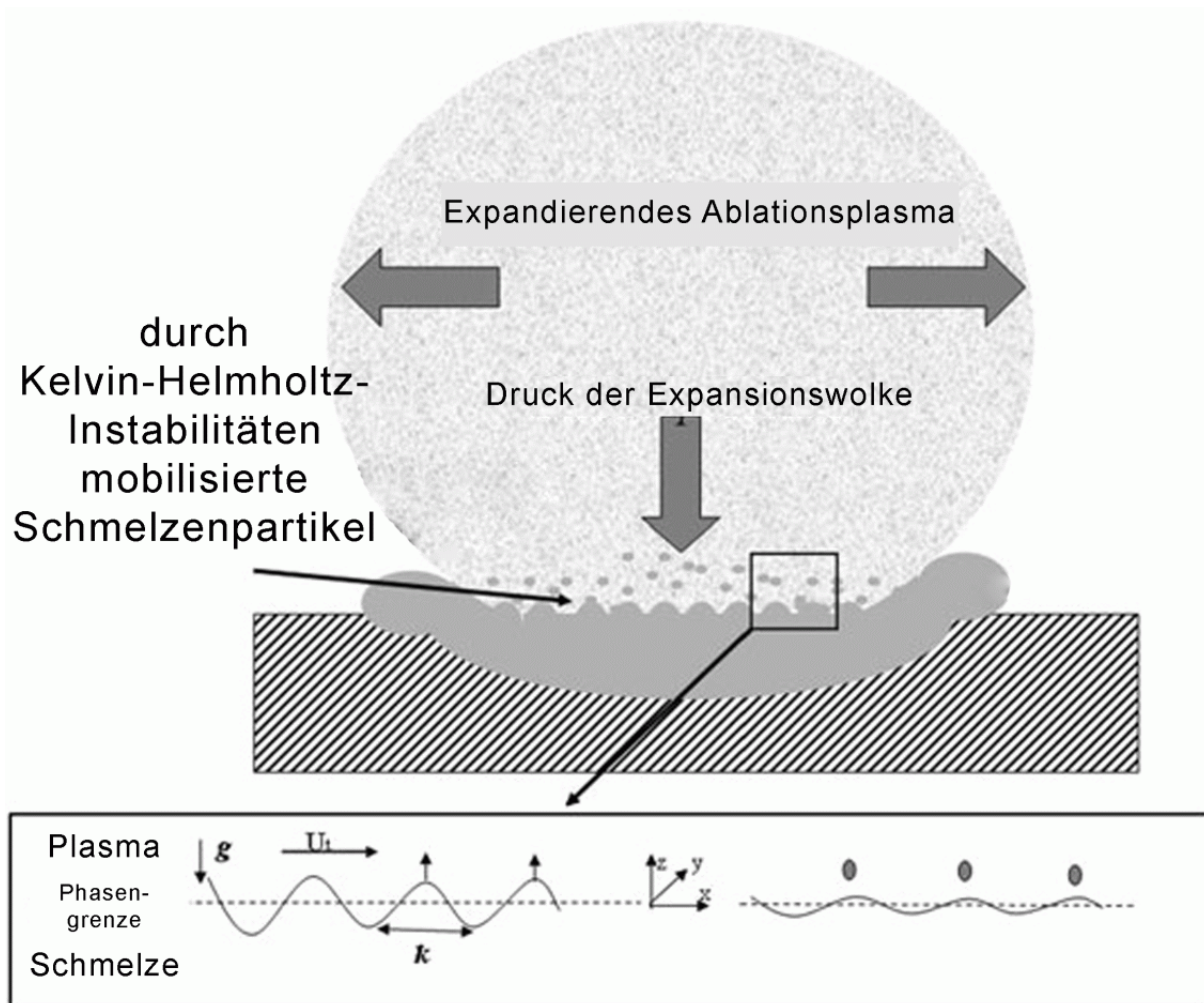
Horn und Günther<sup>[81]</sup> haben in einer Parameterstudie gezielt den Einfluss unterschiedlicher Laserwellenlängen (193 nm vs. 266 nm) auf die Ablation und die anschließende Analyse mittels LA-ICP-MS untersucht. In diesem Vergleich wurden alle anderen Parameter, wie Probenmatrix, Ablationsapparatur, Trägergas, Spotdurchmesser sowie Energie pro Puls konstant gehalten. Auf diese Weise konnte ermittelt werden, dass die abgetragene Masse im verwendeten Wellenlängenbereich nicht von der Wellenlänge abhängig ist. Die Sensitivität ist jedoch bei größeren Wellenlängen geringer, da es eine Verschiebung in der Partikelgrößenverteilung bei größeren Wellenlängen hin zu größeren Partikeln gibt, welche wiederum im Plasma des ICP-MS nicht vollständig aufgeschlossen und ionisiert werden können<sup>[40]</sup>.

Dies scheint zunächst im Widerspruch zum oben erwähnten primären Partikelbildungsmechanismus zu stehen, da dieser von der verwendeten Wellenlänge weitgehend unabhängig ist.

Die Ursache für den Unterschied muss also in Partikeln liegen, die auf einem anderen Weg gebildet werden, im Mittel einen größeren Durchmesser als die Primärkondensationspartikel besitzen und deren Bildungsmechanismus von der Laserwellenlänge abhängig ist. Dies deutet auf die bereits oben (Kapitel 2.1.3.2, S. 11) erwähnten großen, sphärischen Partikel, deren Bildung durch sog. Hydrodynamic Sputtering erklärt werden kann<sup>[57]</sup>.

Dieser Prozess kann vereinfacht anhand der Wirkung eines Laserpulses dargestellt werden. Während ein Laserpuls auf die Probe einwirkt, entsteht zunächst eine dünne Schicht geschmolzener Probe, die schnell soweit erhitzt wird, dass die flüssige Materie verdampft und sogar teilweise ionisiert wird. Durch die plötzliche Verdampfung entsteht ein Druckgradient über der Probe und die Wolke gasförmiger Materie beginnt zu expandieren.





**Abb. 6:** Partikelbildung mittels Hydrodynamic Sputtering durch Kelvin-Helmholtz-Instabilitäten<sup>[57]</sup>

Durch die Expansionsbewegung des Gases entlang der Oberfläche (vgl. Abb. 6) bilden sich auf der flüssigen Grenzfläche mikroskopisch kleine Wellen aus<sup>[57]</sup>. Im Bestreben, eine möglichst kleine Oberfläche zu erreichen und die Amplitude der Wellen zu senken, kommt es zu sogenannten Kelvin-Helmholtz-Instabilitäten<sup>[82]</sup>, die darin münden, dass sich aus den Wellenbergen kleine Tröpfchen abspalten, die durch das expandierende Plasmagas fortgerissen werden und Teil des Partikelgrößenspektrums werden.

Die auf diese Weise gebildeten Partikel entstehen somit aus der Schmelze und haben eine sphärische Form. Ihre Durchmesser liegen zwischen 100 nm und ca. 1  $\mu\text{m}$ <sup>[57]</sup> und sind durch die Dicke der Schmelzschicht sowie deren Viskosität limitiert. Die Bildung ist somit von der Wellenlänge abhängig, da die Dicke dieser Schmelzschicht durch die Wellenlänge bestimmt ist<sup>[65]</sup>.

Die Ausbildung der Schmelzschicht hängt auch von der Pulsdauer des verwendeten Lasers ab. Bei Laserpulsdauern in der Größenordnung der Schwingungsdauern der Atome (fs-Bereich) im Feststoff wird die Energie so schnell übertragen, dass es kaum zur Ausbildung einer Schmelzschicht kommen kann und somit auch kaum sphärische Partikel durch Hydrodynamic Sputtering gebildet werden<sup>[59]</sup>.

#### **2.1.3.2.3 Beitrag des Hydrodynamic Sputtering zur Fraktionierung**

Durch die fraktionierende Verdampfung des Feststoffs während der Ablation kommt es wie bereits erwähnt (Kapitel 2.1.3.1.3, S. 10) in der Gasphase zu einer Anreicherung der leichter flüchtigen Elemente, wohingegen sich die schwerer flüchtigen in der Schmelzschicht aufkonzentrieren.

Da durch den Mechanismus des Hydrodynamic Sputtering große Aerosolpartikel (0,1 bis 1  $\mu\text{m}$ ) gebildet werden, die aus dieser Schmelzschicht stammen, kann erklärt werden, weshalb im Partikelgrößenspektrum die großen sphärischen Partikel mit den schwerer flüchtigen Elementen angereichert sind<sup>[57]</sup>.

Dieser Effekt reduziert die Bruttofraktionierung, kann sie aber nicht vollständig aufheben, da die Partikelbildung durch Hydrodynamic Sputtering wegen ihrer Abhängigkeit von Wellenlänge und Pulsdauer nicht im selben Maße stattfinden kann wie durch den primären Verdampfungsmechanismus. Ebenso ist ein vollständiger Aufschluss und Ionisation der großen sphärischen Partikel ( $>0,15 \mu\text{m}$  Durchmesser) im Plasma des ICP-MS nicht mehr gewährleistet<sup>[83]</sup>. Die Fraktionierung ist also von der Partikelgrößenverteilung abhängig<sup>[43]</sup>.

### **2.1.4 Transport des Aerosols**

Zwei Faktoren beschreiben den Transport des lasergenerierten Aerosols ins Plasma des ICP-MS: die Überführungseffizienz und die Überführungsgeschwindigkeit.

Die Überführungsgeschwindigkeit hängt im Wesentlichen von der Gasflussrate, dem Volumen der Ablationskammer und der Schläuche zum ICP-MS ab.

Die Überführungseffizienz des Aerosols ist abhängig von der Partikelgrößenverteilung, dem Trägergas, der Form der Ablationskammer und der Länge des Transportwegs.

In frühen Studien<sup>[36,84]</sup> zur Überführungseffizienz wurden zum Teil recht unterschiedliche Wiederfindungsraten von 10% bis 60% für den Transport des Feststoffaerosols gefunden, welches durch Laser mit Pulslängen im Nanosekundenbereich erzeugt wurde. Für die Femtosekunden-Laser generierten Aerosole sind Überführungsraten um die 80 % bekannt<sup>[85,86]</sup>. Die Ursachen dieser großen Unterschiede werden im Folgenden behandelt.

#### **2.1.4.1 Partikelgrößenbeschränkung und Fraktionierung durch den Transport**

Nach der Expansion des Laser generierten Feststoffaerosols in das fließende Trägergas werden die Aerosolpartikel durch Reibung mit dem Gas in Flussrichtung beschleunigt, bis sie dieselbe Geschwindigkeit wie das Gas haben. Anschließend findet der Transport durch Ablationskammer und Schläuche bis in das Plasma des ICP-MS statt.

Es gibt jedoch auch Faktoren, die verhindern, dass Partikel aller Größen das Plasma erreichen können. Hierzu zählen Diffusion, Gravitation und die Trägheit der Partikel.

Die Diffusion schränkt den Transport von Partikeln ein, die kleiner sind als die mittlere, freie Weglänge der Gasteilchen des Trägergases. Solche kleinen Partikel stoßen nicht mehr oft genug mit Gasteilchen aus Gasflussrichtung, um mit der Strömung transportiert werden zu können. Für Helium beträgt die mittlere freie Weglänge bei Raumtemperatur und Umgebungsdruck ca. 200 nm, für Argon ungefähr 76 nm<sup>[87]</sup>. Je kleiner die Partikel sind desto stärker ist dieser Effekt.

Für Partikel im  $\mu\text{m}$ -Bereich wirkt sich die Gravitation auf die Überführungseffizienz aus. Baron und Willeke<sup>[88]</sup> erklären dies vereinfacht folgendermaßen:

Bei horizontal liegenden Schläuchen, wie sie in der LA-ICP-MS üblich sind, ist die maximale Fallhöhe, aus der ein Partikel zu Boden fallen kann, durch den Innendurchmesser der Schläuche bestimmt. Die Fallgeschwindigkeit der Partikel wird neben Konstanten wie der Erdbeschleunigung, der Viskosität des Trägergases und dessen Dichte, sowie der Dichte der Partikel nur vom Partikelradius bestimmt und ist konstant. Je größer der Radius ist desto schneller fällt der Partikel. Ist die theoretische vertikale Strecke, die ein Partikel zurücklegt, während er über die

horizontale Länge des Transportweges transportiert wird, größer als die maximale Fallhöhe, so fällt er aus der Gasphase aus.

Unter bei der LA-ICP-MS üblichen Bedingungen wie einem Transportweg von einem Meter, einer Gasflussrate von 1 L/min und einem Schlauchinnendurchmesser von 4 mm ergibt sich für Helium und Argon folgendes Bild an Überförungsverlusten in Abhängigkeit von der Partikelgröße (Abb. 7)

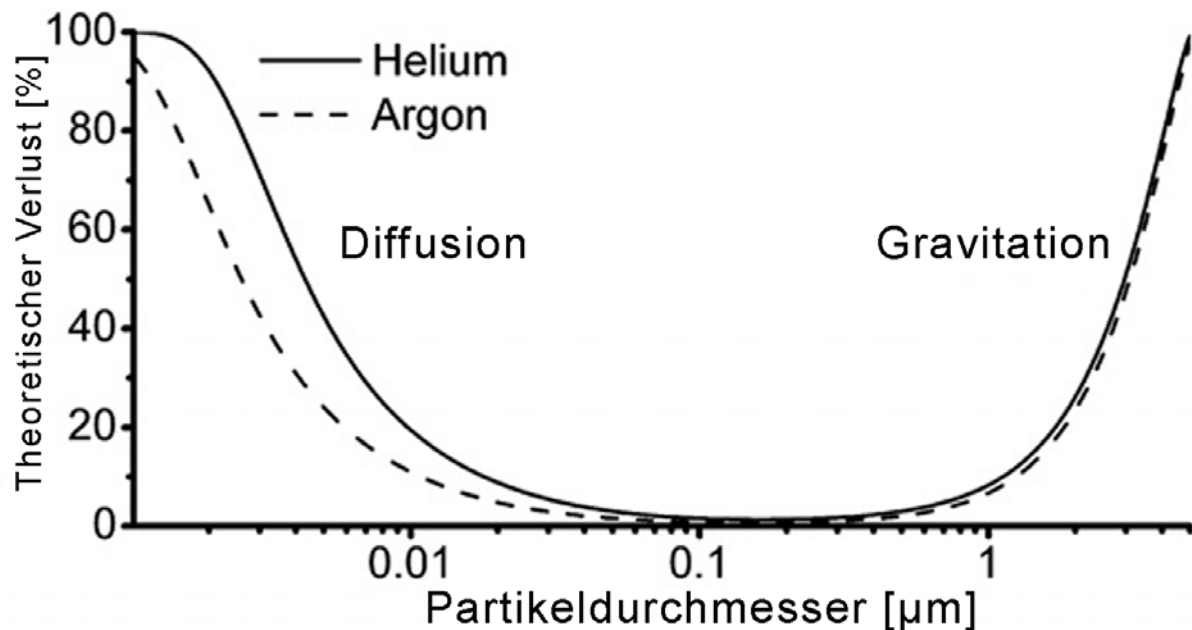


Abb. 7: Überförungsverluste in Abhängigkeit von Partikeldurchmesser und Trägergas bei einer Überförungsstrecke von 1 m, einem Innendurchmesser von 4 mm und einer Gasflussrate von 1 L/min<sup>[55]</sup>

Die letzte Quelle für Überförungsverluste kann die Trägheit der Partikel sein. Wenn das Aerosol um enge Kurven gelenkt wird, können sich große Partikel auf Grund der Zentrifugalkraft an der Außenwand absetzen<sup>[55]</sup>. Dies geschieht nach einem ähnlichen Mechanismus wie das gravitationsbedingte Ausfallen, nur dass nicht die Erdbeschleunigung, sondern die Zentrifugalkraft (auf Grund der Trägheit der Partikel) die Partikel in Richtung der Wandung beschleunigt. Größere Partikel bewegen sich senkrecht zur Flussrichtung gesehen schneller auf die Wandung zu als kleinere, so dass es zum Absetzen der größeren Partikel kommt.

Da die chemische Zusammensetzung der Aerosolpartikel in Abhängigkeit von ihrer Größe vom untersuchten Feststoff abweicht (Kapitel 2.1.3.2, S. 11), wirkt sich ein größenabhängiger Transport letztendlich auf das Analysenergebnis aus<sup>[55]</sup>. Dieser

Effekt wird Fraktionierungseffekt des Transports genannt. Durch Verwendung von Femtosekundenlasern kann die Partikelgrößenverteilung des Aerosols soweit erniedrigt werden, dass es nur noch zu geringen größenabhängigen Transportverlusten kommt<sup>[86]</sup>.

#### **2.1.4.2 Gasflussrate**

Der Volumenstrom des Trägergases ist ein wesentlicher Parameter in Bezug auf die Überführungsgeschwindigkeit und -effizienz des Aerosols ins Plasma des ICP-MS, der zeitlichen Auflösung der Aerosolzusammensetzung, sowie der Vollständigkeit des Aufschlusses der Partikel im Plasma und hiermit der Signalstabilität.

Je langsamer die Strömungsgeschwindigkeit ist, desto länger dauert der Transport des Feststoffaerosols ins Plasma und desto mehr Partikel können sich aus der Gasphase absetzen und werden nicht mehr vom Analysator erfasst. Bei zeitaufgelösten Messungen mit großen Flussraten lässt sich eine bessere Auflösung erreichen, da die Zeit der diffusiven Rückvermischung im Aerosol kleiner ist.

Abhängig vom Gerät gibt es jedoch eine natürliche Grenze, ab der große Partikel im induktiv gekoppelten Plasma nicht mehr vollständig atomisiert und ionisiert werden können. Bei zu hohen Gasflussraten wird die Zeit, die Partikel im Plasma verbringen soweit erniedrigt, dass große Partikel nur teilweise aufgeschlossen an der anderen Seite des Plasmas wieder austreten und sich am Vakuuminterface abscheiden<sup>[89]</sup>. Dies führt zu mangelhafter Signalstabilität.

Bei der Verwendung von Helium als Trägergas ist es zudem allgemein anerkannt, dem Feststoffaerosol vor der Plasmafackel Argon beizumischen<sup>[79]</sup>, um den Aufschluss der Partikel und die Ionisation der enthaltenen Atome zu begünstigen. Das induktiv gekoppelte Plasma wirkt dadurch nicht nur thermisch von außen auf den zentral in die Plasmafackel eingebrachten probenaerosolhaltigen Heliumstrom ein, sondern wird auch innerhalb des zentralen Trägergasstromes gebildet, was zu einer höheren Temperatur in der analytischen Zone führt und die bessere Aufschlusseffizienz erklärt.

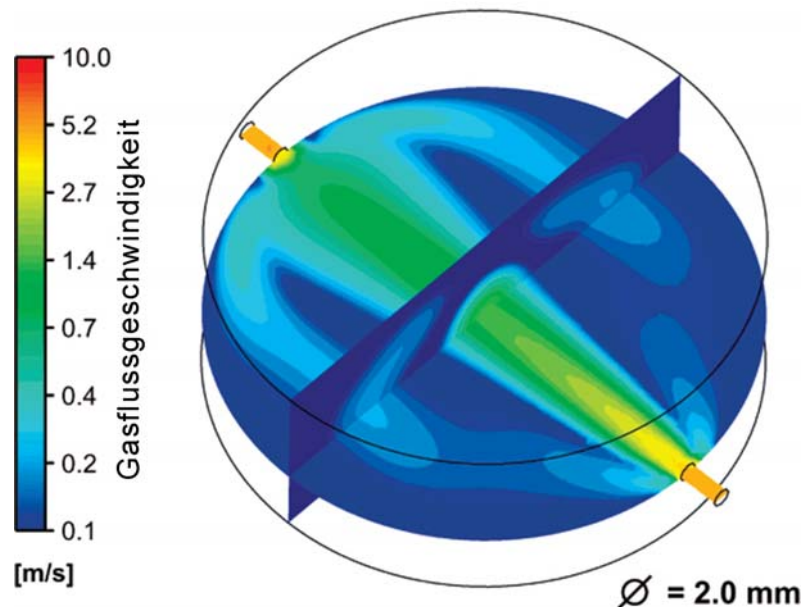
Verwendet man Helium als Trägergas, so ist das Flussverhalten der bei der LA-ICP-MS eingesetzten Gasströme (0,5 bis 2 L/min) stets laminarer Natur, das heißt, es tritt in der Ablationskammer keine vollständige Vermischung über das ganze Kammervolumen ein. Dies hat zur Folge, dass das Aerosol bei einem kurzen Weg

ins Plasma (<20 cm) noch nicht vollständig homogenisiert sein kann und eine größere Standardabweichung auftritt, als wenn eine turbulente Strömung vorliegen würde<sup>[90]</sup>.

Bei der Verwendung von Argon statt Helium, einer Gasflussrate ab 0,75 L/min und einer Einlassöffnung von 0,5 mm Durchmesser ist es möglich, turbulente Strömungsbedingungen in der Ablationskammer zu erzeugen<sup>[90]</sup>. Diese bringen eine Verbesserung der Präzision der Ergebnisse mit sich. Die Auswaschzeit des Aerosols aus der Ablationskammer ist jedoch stets größer als im laminaren Strömungsfall<sup>[90]</sup>, so dass eine schlechtere zeitliche Auflösung des Elementsignals die Folge ist.

#### **2.1.4.3 Ablationskammerlayout**

Für den schnellen Transport des Aerosols in das Plasma des ICP-MS ist neben der Gasflussrate das Design der Ablationskammer von großer Bedeutung. Entscheidende Faktoren sind hierbei neben dem Ablationskammervolumen die Form der Kammer an sich, sowie die Beschaffenheit der Trägergaseingangsdüse<sup>[85]</sup>. Zusammen mit der Art des Trägergases und der Gasflussrate bestimmen sie, ob es in der Ablationskammer zu laminarem oder turbulentem Strömungsverhalten kommt. Bei laminarem Strömungsverhalten (vgl. Abb. 8), wie es bei der Verwendung von Helium bei den in der LA-ICP-MS üblichen Flussraten der Fall ist, wird ein Großteil des lasergenerierten Aerosols direkt vom Gasstrom erfasst und ohne Verwirbelung aus der Ablationskammer in das induktiv gekoppelte Plasma des ICP-MS überführt<sup>[90]</sup>.



**Abb. 8:** Simuliertes Strömungsbild in einer zylindrischen Ablationskammer mit 1L/min Helium und 2 mm Einlassdüse (zu sehen: laminare Strömungsbedingungen)<sup>[90]</sup>

Es kommt zu kürzeren Auswaschzeiten des Aerosols als im turbulenten Strömungsfall, allerdings kann es auch zu Totzonen kommen, so dass sich ein Teil des Aerosols absetzen kann und nicht durch das ICP-MS erfasst wird<sup>[90]</sup>.

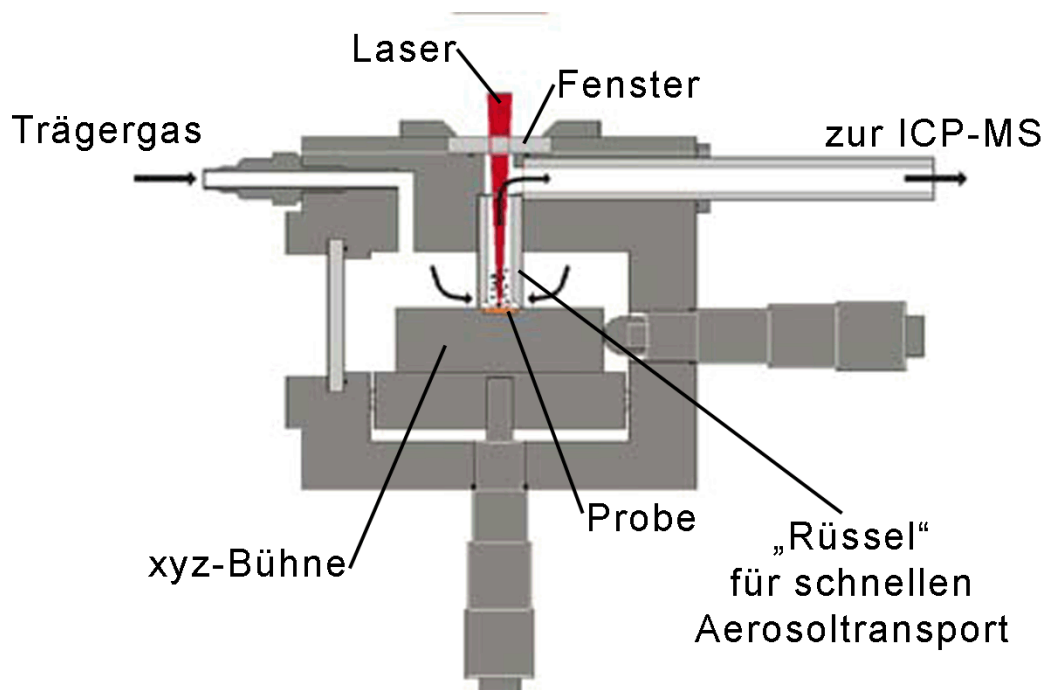
Bei großen Ablationskammern ist im laminaren Strömungsfall die Überföhrungseffizienz des Aerosols vom Ort der Ablation in der Kammer abhängig<sup>[91]</sup>.

Verwendet man Argon als Ablationsgas, so sind bei der Wahl entsprechender Parameter (kleine Eingangsdüsenöffnung  $<1 \text{ mm}$ , hohe Flussrate  $>1 \text{ L/min}$ ) auch turbulente Strömungsbedingungen in der Ablationskammer zu erreichen<sup>[90]</sup>. Hierbei wird das durch einen Laserpuls erzeugte Aerosol im Idealfall gleichmäßig über das gesamte Ablationskammervolumen verteilt, wie in einem kontinuierlich betriebenen Röhrekesselreaktor (CSTR)<sup>[92]</sup> ständig mit frischem Trägergas verdünnt und beständig aus der Ablationskammer ausgetragen. Der Anteil an Feststoff im Aerosol nimmt exponentiell mit der Zeit ab. Je größer das Kammervolumen desto länger dauert es, bis das Aerosol eines Laser-Ablationspulses aus der Kammer ausgetragen ist.

Um turbulente Strömungsbedingungen zu erreichen, muss die Eingangsdüse einen sehr kleinen Durchmesser aufweisen. Dies föhrt zu hohen Eintrittsgeschwindigkeiten des Trägergases in die Ablationskammer, zur Beschleunigung der Durchmischung des Aerosols in der Kammer und zum Erhalt eines homogenen Aerosols. Da es kaum zu Totzonen kommen kann, hat der Formfaktor bei turbulenten

Strömungsbedingungen abgesehen vom Zellvolumen keinen großen Einfluss auf das Auswaschverhalten und die Wiederfindungsrate.

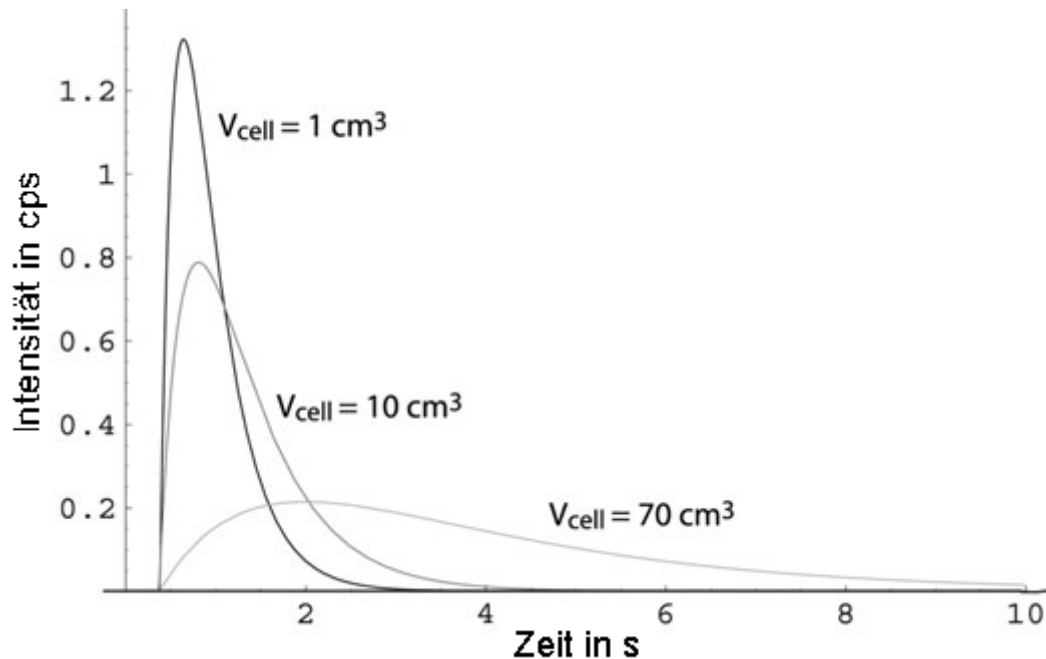
Turbulente Strömungsbedingungen sind, was die Homogenität des Aerosols angeht, zwar wünschenswert, aber durch Helium auf Grund seiner niedrigen Viskosität nicht zu erreichen. Deshalb ist ein Trend zu neuen Ablationskammerdesigns festzustellen<sup>[36,49,54,85]</sup>. Diese fangen das Aerosol direkt über der Probe mit einer Art Rüssel ab (Abb. 9) und halten so das Volumen, in dem sich das Aerosol befindet, möglichst klein<sup>[49]</sup>.



**Abb. 9:** Schematischer Aufbau einer Ablationskammer im „Rüsseldesign“<sup>[85]</sup>

Das „Rüsseldesign“ führt zu einer hohen Überführungseffizienz und vermeidet Totzonen. Auf diese Weise ergeben sich extrem kurze Auswaschzeiten (vgl. Abb. 10) und eine hohe zeitliche Auflösung des ICP-MS-Signals, die zu einem hohen lateralen Auflösungsvermögen bei orts aufgelösten Untersuchungen oder Tiefenprofilscans führt.





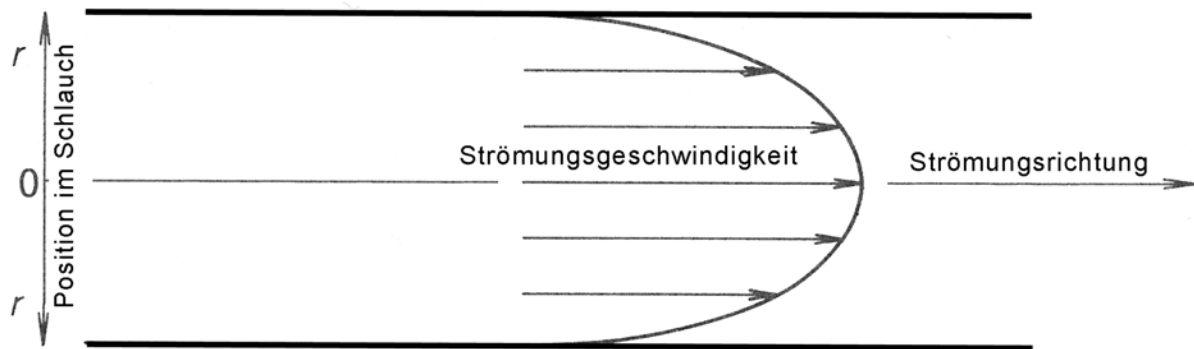
**Abb. 10:** Simuliertes Elementsignal der LA-ICP-MS für unterschiedliche Ablationskammervolumina bei einer Gasflussrate von 1 L/min<sup>[93]</sup>

Zu beachten ist bei Ablationskammern diesen Typs, dass der Innendurchmesser groß genug bleiben muss, um Kollisionen der noch expandierenden, flüssigen Aerosolpartikel mit der Wandung zu vermeiden, da diese sich ansonsten abscheiden<sup>[91]</sup>.

Vor kurzem wurde theoretisch simuliert, wie sich eine Zuführung des Argonstroms unmittelbar oberhalb des Ablationsortes in einer solchen „Rüsselzelle“ auswirken würde<sup>[54]</sup>. Die Ablation an sich kann in reinem Helium stattfinden, aber der weitere Transport erfolgt mit Hilfe von zugemischtem Argon und hat eine bessere Homogenisierung durch ein turbulenteres Strömen zur Folge.

#### 2.1.4.4 Schlauchlänge

Die Schlauchlänge hat auf den Aerosoltransport und damit auf die analytische Performance Einfluss. Je länger der Schlauch ist desto länger dauert der Transport des Aerosols zur ICP-MS und desto breiter können auf Grund des paraboloiden Strömungsprofils<sup>[94]</sup> einer laminaren Strömung (siehe Abb. 11) und der dadurch verursachten Rückvermischung die Signale werden<sup>[95]</sup>.



**Abb. 11:** Skizze des paraboloiden Geschwindigkeitsprofils in einer laminaren Strömung in einem Schlauch<sup>[94]</sup>

Eine große Schlauchlänge wirkt sich auch auf die Überföhrungseffizienz aus, da eine vergrößerte Wahrscheinlichkeit besteht, dass sich große Aerosolpartikel durch die Gravitation oder in engen Kurven durch ihre Trägheit aus der Gasphase absetzen. Da durch den gravitativen oder trägheitsbedingten Ausfall aus der Gasphase hauptsächlich größere Partikel abgeschieden werden und die chemisch stöchiometrische Zusammensetzung der Partikel größenabhängig ist (siehe Kapitel 2.1.3.2, S. 11), kommt es bei größeren Schlauchlängen auch zu größeren Fraktionierungseffekten.

Zu Memoryeffekten ausgefallener Partikel und dadurch bedingter Erhöhung des Elementhintergrundsignals kommt es im Allgemeinen nicht, da die ausgefallenen Partikel an Ort und Stelle bleiben und nicht mehr ins Aerosol zurückgelangen<sup>[91]</sup>.

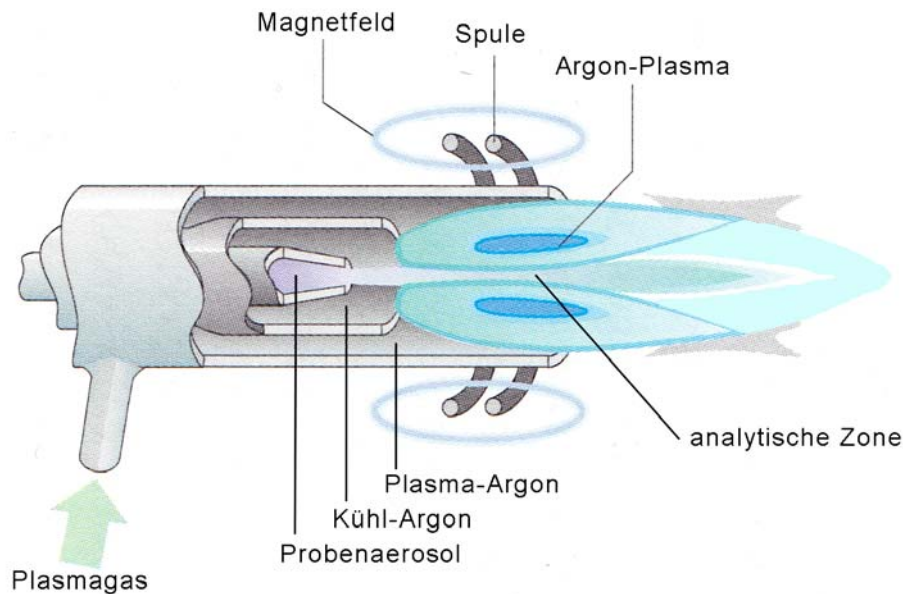
## 2.1.5 Detektion des lasergenerierten Aerosols im ICP-MS

### 2.1.5.1 ICP-MS

Das induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometer (ICP-MS) ist vor ca. 28 Jahren in die Elementanalytik eingeföhrt worden<sup>[96-98]</sup>. Es bietet eine starke Multielementfähigkeit, mit der in einer Analyse fast 80 Elemente quasi simultan innerhalb weniger Sekunden bestimmt werden können, sowie einen großen dynamischen linearen Bereich von über acht Größenordnungen.

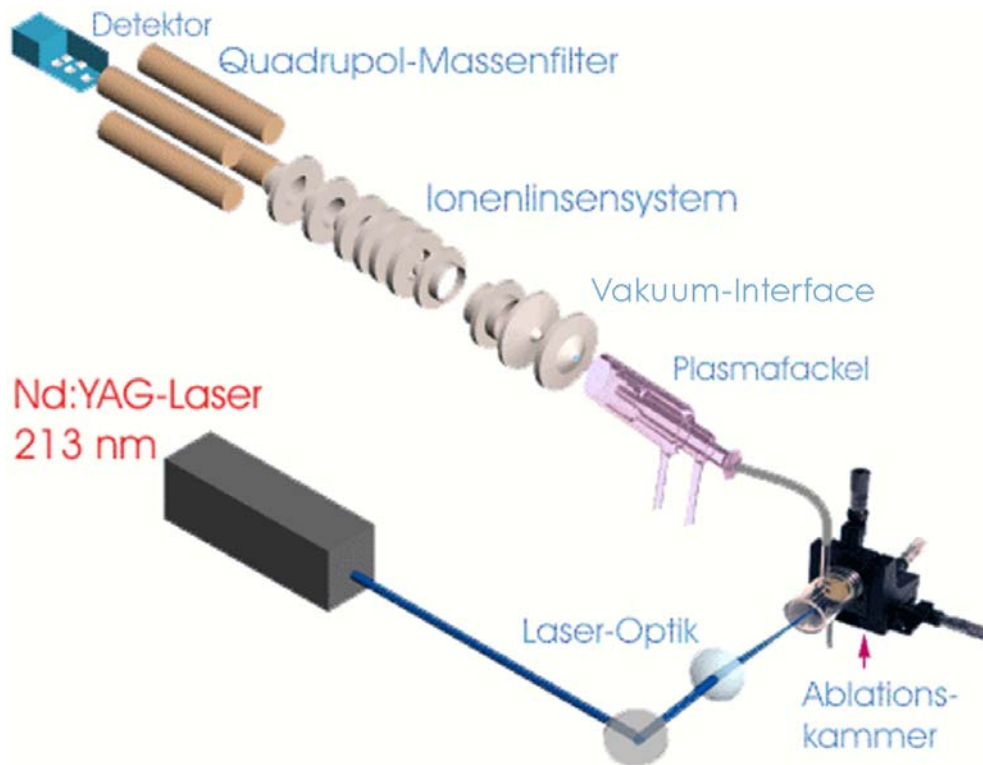
Die Proben werden dem ICP-MS in Form eines Aerosols zugeföhrt, das bei flüssigen Proben über einen Zerstäuber oder bei festen Proben mittels einer Laser-

Ablationsapparatur erzeugt wird. Die Zuführung geschieht mittig in ein Argon-Plasma hinein. (vgl. Abb. 12)



**Abb. 12: Plasmafackel eines ICP-MS<sup>[99]</sup>**

Dieses Plasma wird durch den Stoß freier Elektronen, die im induzierten Magnetfeld einer hochfrequenten Wechselspannung (27,1 MHz oder 40,6 MHz; 700-1700 W) gefangen sind, mit Argonatomen aus dem zugeführten Plasmagas erzeugt<sup>[100]</sup>. Das stoßende Elektron erzeugt aus dem Argonatom ein einfach positiv geladenes Argonkation ( $\text{Ar}^+$ ) sowie ein weiteres freies Elektron. Das freiwerdende Elektron wird ebenfalls durch das Magnetfeld beschleunigt. Es kann seinerseits mit Argonatomen stoßen, so dass es zu einer Kettenreaktion kommt, die zur Aufrechterhaltung des Plasmas führt und die solange anhält, wie das Magnetfeld durch die Wechselspannung aufrecht erhalten wird. Die Initialzündung, die die ersten freien Elektronen aus Argonatomen erzeugt, wird durch einen sog. Teslafunken erreicht, der über die Teslaspule initiiert wird<sup>[100]</sup>. Das Plasma erreicht extreme Temperaturen von ca. 5000 bis 12500 K<sup>[101]</sup>. Es bewirkt, dass die Analyten zunächst verdampft, atomisiert und anschließend zumindest teilweise ionisiert werden. Der Grad der Ionisierung ist im Wesentlichen vom Verhältnis des ersten Ionisierungspotentials des jeweiligen Elements relativ zu dem von Argon (15,76 eV) abhängig. So werden je nach Element im Argonplasma hauptsächlich einfach geladene Ionen mit Ausbeuten zwischen 5 und 100 % produziert<sup>[100]</sup>.



**Abb. 13:** Schematischer Aufbau eines ICP-MS, das mit einem Laser-Ablationssystem als Probenzufuhr gekoppelt ist

Dem Plasma nachgeschaltet ist, durch Blenden getrennt, die nur einen kleinen Teil des Ionenstroms durchlassen, ein Hochvakuumbereich mit einem Ionenlinsensystem, welches dazu dient, Neutralteilchen und Photonen aus dem Ionenstrahl zu entfernen und diesen weiter zu bündeln. Anschließend wird der Ionenstrahl durch einen Quadrupol-Massenfilter geführt, der nur noch die Ionen mit dem Masse/Ladungs-Verhältnis durchlässt, die gerade erfasst werden sollen. Durch schrittweise Änderung der Spannungsparameter des Quadrupols können in schneller Folge (in wenigen Hundertstelsekunden) selektiv verschiedenste Isotope gescannt werden. Da jedes Element mindestens ein Isotop besitzt, dessen Masse bei keinem natürlichen Isotop eines anderen Elements auftritt, können auf diese Weise fast alle Elemente des PSE analysiert werden.

Die Detektion der Analytione erfolgt durch einen Dual-Mode-Sekundärelektronenvervielfacher<sup>[9,101]</sup>. Bei geringen Konzentrationen wird im sog. Pulsmodus (P) gemessen. Analytione treffen auf die erste, stark negativ geladene Dynode und schlagen jeweils zwei bis drei Elektronen heraus (vgl. Abb. 14). Diese werden in Richtung auf die zweite Dynode beschleunigt, schlagen dort wieder jeweils zwei bis drei Elektronen raus und so weiter, so dass es in der Dynodenkaskade zu einer Elektronenlawine kommt. Diese kleinen Signale werden verstärkt, an die

Software übertragen und als sog. Counts ausgegeben. Dies funktioniert bei Konzentrationen in den ersten 6 Größenordnungen des dynamischen Bereichs.

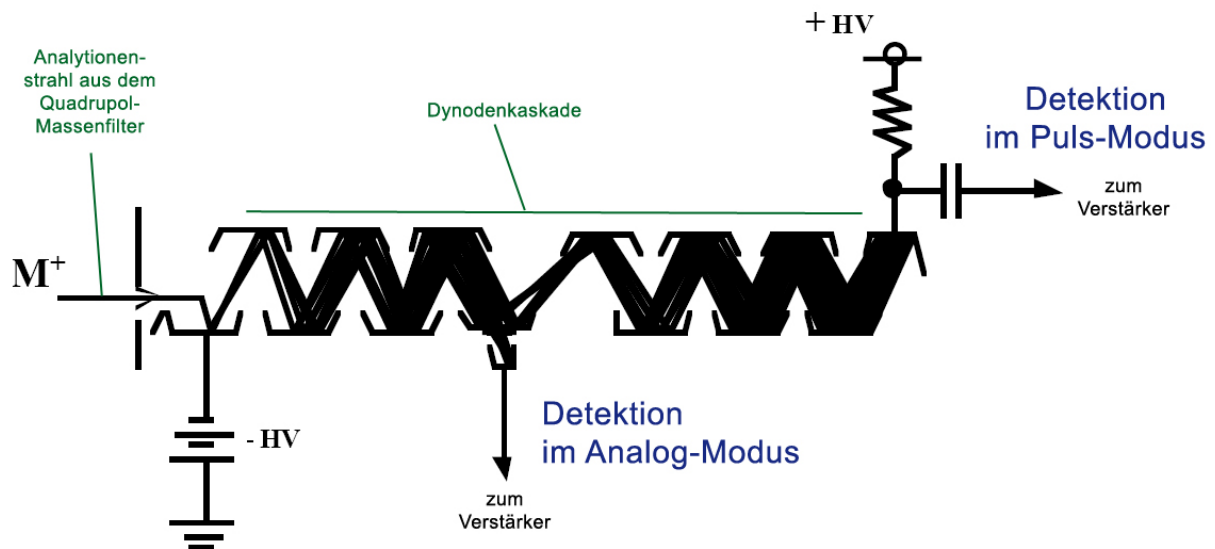


Abb. 14: Dual-Mode-Sekundärelektronenvervielfacher

Bei höheren Konzentrationen würde es zu einem Sättigungseffekt des Detektors kommen, daher werden diese mittels Analogmodus (A) gemessen. Hierzu wird nach der ersten Hälfte der Dynodenkaskade direkt der durch die Sekundärelektronen verursachte Strom registriert. Dieser wird anschließend direkt durch den sog. P/A-Faktor in ein Signal in Counts umgerechnet. P/A-Faktoren sind von der Analytinenmasse abhängig und müssen vor der Messung bei einer Übergangskonzentration eingestellt werden, die mit beiden Modi zu messen ist.

Durch eine Vielzahl von möglichen Ankopplungen an das ICP-MS werden die unterschiedlichsten Anwendungen möglich<sup>[5]</sup>, wie beispielsweise die Elementspeziation durch die Kopplung mit der Flüssigkeitschromatographie (LC)<sup>[4]</sup>, der Kapillarelektrophorese (CE)<sup>[102]</sup> oder der Gaschromatographie (GC)<sup>[3]</sup>. Durch Verwendung eines Laser-Ablationssystems als Probenzuführung können Feststoffe direkt analysiert werden, ohne die Probe dem Risiko der Kontamination durch aufwendige Probenvorbereitung wie etwa Aufschlüssen aussetzen zu müssen<sup>[103]</sup>.

Die Nachweisgrenzen der Methode liegen bei der direkten Flüssigkeitsaufgabe im Bereich von  $10^{-12}$  bis  $10^{-15}$  g/g<sup>[101]</sup>. Bei der LA-ICP-MS liegen die Nachweisgrenzen

auf Grund der wesentlich niedrigeren Probenmenge, die ins ICP-MS eingebracht wird, um einige Größenordnungen höher im Bereich von  $10^{-6}$  bis  $10^{-9}$  g/g<sup>[104]</sup>.

#### 2.1.5.2 Verhalten des Ablationsaerosols im Plasma

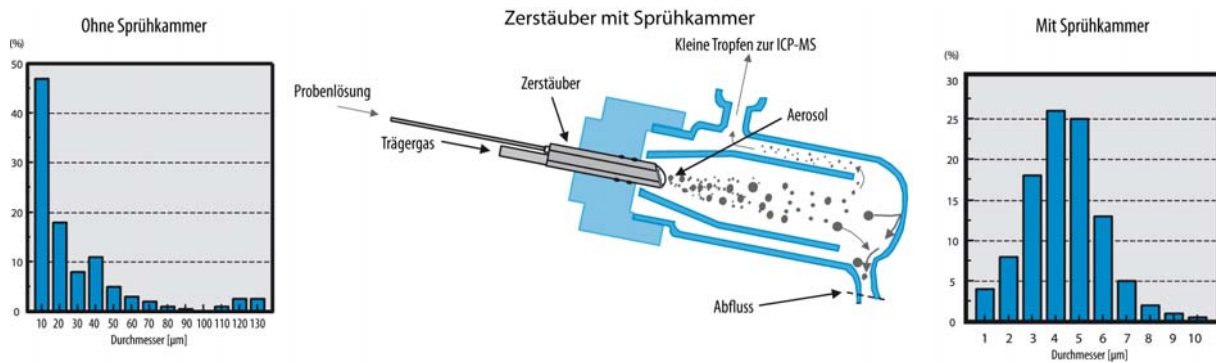
Im Allgemeinen gilt bei der ICP-MS, dass Aerosolpartikel, die ins Plasma gelangen, verdampft, ionisiert und atomisiert werden. Gelangt jedoch eine große Menge Probe ins Plasma, so können die Plasmabedingungen verändert werden, wie zum Beispiel die Temperatur und damit auch die Ionisierungseffizienz.

Bei großer Beladung des Plasmas kommt es bei den dicht gedrängten, positiven Analytionen außerdem zu einer gegenseitigen elektrostatischen Abstoßung, die bewirkt, dass Ionen aus ihrer Flugbahn gedrängt werden<sup>[105]</sup>. Die Überföhrungseffizienz der Ionen ins Vakuum wird negativ beeinflusst und der lineare Zusammenhang des erhaltenen Signals mit der ins Plasma eingebrachten Konzentration eines Elements geht verloren.

Bisher konnte ein solcher Effekt für die LA-ICP-MS jedoch noch nicht eindeutig nachgewiesen werden, da die ins Plasma eingebrachte Masse bei der LA-ICP-MS gegenüber der ICP-MS mit Flüssigaufgabe um mehrere Größenordnungen geringer ist. Für letztere ist der Effekt allerdings seit langem bekannt<sup>[105]</sup>.

Neben Effekten hoher Beladung des Plasmas hängt die Ionisationseffizienz von der Partikelgröße ab. Da die Aerosolteilchen die analytische Zone des induktiv gekoppelten Plasmas mit einer hohen Geschwindigkeit (15 bis 70 m/s)<sup>[106]</sup> innerhalb weniger Millisekunden durchqueren, kann das Plasma die Partikel ab einem bestimmten Größenschwellenwert trotz der extrem hohen Temperaturen nicht mehr vollständig aufschließen und ionisieren.

Die genaue Lage dieses Schwellenwerts ist materialabhängig. Im Falle der Flüssigaufgabe von wässrigen Lösungen zum ICP-MS liegt er je nach Gerätetyp zwischen 10 bis 18  $\mu\text{m}$ <sup>[106,107]</sup>. Um die Partikelgröße eines zerstäubergenerierten Flüssigkeitsaerosols auf diese maximale Größe zu beschränken, kommt eine sogenannte Sprühkammer zur Verwendung (Abb. 15), in der sich alle Partikel größeren Durchmessers an der Wandung abscheiden<sup>[108]</sup>.



**Abb. 15: Partikelgrößenspektren eines Zerstäubers mit (rechts) und ohne (links) Sprühkammer sowie Skizze eines Zerstäubers in einer Sprühkammer (Mitte)<sup>[108]</sup>**

Bei der Analyse mittels LA-ICP-MS gelangen ausschließlich feste Aerosolpartikel ins Plasma des ICP-MS. Die kritische Partikelgröße für deren vollständige Atomisierung und Ionisation liegt hier wesentlich niedriger, für eine Glasmatrix beispielsweise bei ca.  $0,15 \mu\text{m}$ <sup>[109]</sup>.

Diese Größe liegt mitten im Größenspektrum der von der Laser-Ablation erzeugten Partikel (Abb. 3 links, S. 12) und auf Grund der größenabhängigen Zusammensetzung der Aerosolpartikel (Kapitel 2.1.3.2, S. 11) kommt es zu einer Abweichung der gemessenen Konzentrationsverhältnisse von der stöchiometrischen Zusammensetzung der Probe. Dies ist der sog. Fraktionierungseffekt im Plasma.

Partikel mit einer Größe von über 150 nm werden fast ausschließlich durch den Partikelbildungsmechanismus des „Hydrodynamic Sputtering“ gebildet. Dieser ist stark von der verwendeten Laserwellenlänge und der Pulslänge abhängig. Auf Grund dieser Abhängigkeiten gibt es einen Trend zu kürzeren Wellenlängen (von 266 nm über 213 nm und 193 nm<sup>[65]</sup> bis hin zu 157 nm<sup>[41]</sup>) und kürzeren Pulslängen (fs-Bereich), um nur noch Aerosolpartikel kleinerer Größe (<150 nm) zu erzeugen und so Fraktionierungseffekte möglichst gering zu halten oder in Zukunft möglicherweise vollständig zu vermeiden.

### 2.1.5.3 Molekulare isobare Interferenzen

Ein Problem bei der Analyse einer Probe mittels ICP-MS ist die relativ geringe Auflösung des Quadrupolmassenfilters. Diese verhindert, dass molekulare Ionen mit einem ähnlichen Masse/Ladungsverhältnis vom eigentlich untersuchten Isotop

getrennt werden können. Um diese sogenannten molekularen isobaren Interferenzen bei der Analyse einer Probe mittels ICP-MS zu umgehen, gibt es zwei Möglichkeiten:

Es kann ein hochauflösendes Massenspektrometer als Analysator verwendet werden. Ein solches Gerät wäre zum Beispiel ein doppeltfokussierendes Sektorfeld-Massenspektrometer, das zur Massentrennung keinen Quadrupol verwendet, sondern ein sektorförmiges magnetisches und sektorförmiges elektrostatisches Feld<sup>[100]</sup>. Hiermit können Massen bis zu einer Auflösung ( $m/\Delta m$ ) von ca.  $10^6$  erreicht werden, so dass die Signale von Interferenz und zu messendem Element klar getrennt werden können.

Eine weitere Möglichkeit Störsignale aus isobaren molekularen Interferenzen zu minimieren, ist die Verwendung eines ICP-MS mit einer Kollisionszelle. Hierbei wird durch Stöße mit einem Gas die kinetische Energie der störenden Molekülonen auf Grund ihres größeren Stoßquerschnittes stärker herabgesetzt als bei den Analytionen, so dass sie eine elektrostatische Energiebarriere nicht überwinden können und nur die Atomionen detektiert werden können. Alternativ hierzu kann auch eine sog. Reaktionszelle verwendet werden. Sie ist identisch aufgebaut und unterscheidet sich lediglich im zugeführten Gas. Hierbei werden reaktive Gase (z.B.:  $H_2$  oder  $NH_3$ ) zugeführt, so dass die störenden Ionen möglichst quantitativ mit diesen reagieren und nicht mehr auf der zu untersuchenden Masse detektiert werden können.

#### **2.1.5.4 Anwendbarkeit der Reaktionszellentechnologie**

Der sinnvollen Verwendung der Reaktionszellentechnologie bei Analysen mittels LA-ICP-MS stehen zwei Hindernisse im Wege.

Eine wichtige Anwendungsbeschränkung besteht darin, dass der bei der Flüssigkeitsaufgabe-ICP-MS übliche Wechsel zwischen den Gas-Modi (ohne Gas; Kollisionsgas; Reaktionsgas) je nach Analyt für die LA-ICP-MS bei zeitaufgelösten Messungen nicht durchführbar ist. Der Umschaltvorgang zwischen den Gasmodi benötigt jeweils mehrere Sekunden, so dass bei zeitaufgelösten Messungen nur in einem Modus gemessen werden kann.

Das zweite Hindernis ist die Tatsache, dass der Massenfluss der Probe, der durch die Laser-Ablation ins Plasma des ICP-MS eingebracht wird, schon unter normalen



Analysebedingungen gegenüber der Flüssigaufgabe um rund 5 Größenordnungen geringer ist<sup>[33,108]</sup>.

Dies hat zwar einerseits den Vorteil, dass auch die Hauptbestandteile einer Probe direkt per LA-ICP-MS bestimmt werden können. (Bei der Untersuchung von Lösungen ist dies nicht möglich, da es zu übergroßen Signalen führen und dem Detektor des ICP-MS schaden würde.) Andererseits leiden aber die Nachweisgrenzen der LA-ICP-MS darunter, so dass sie üblicherweise, wenn keine molekularen isobaren Interferenzen auftreten, im oberen ng/g-Bereich liegen<sup>[104]</sup>.

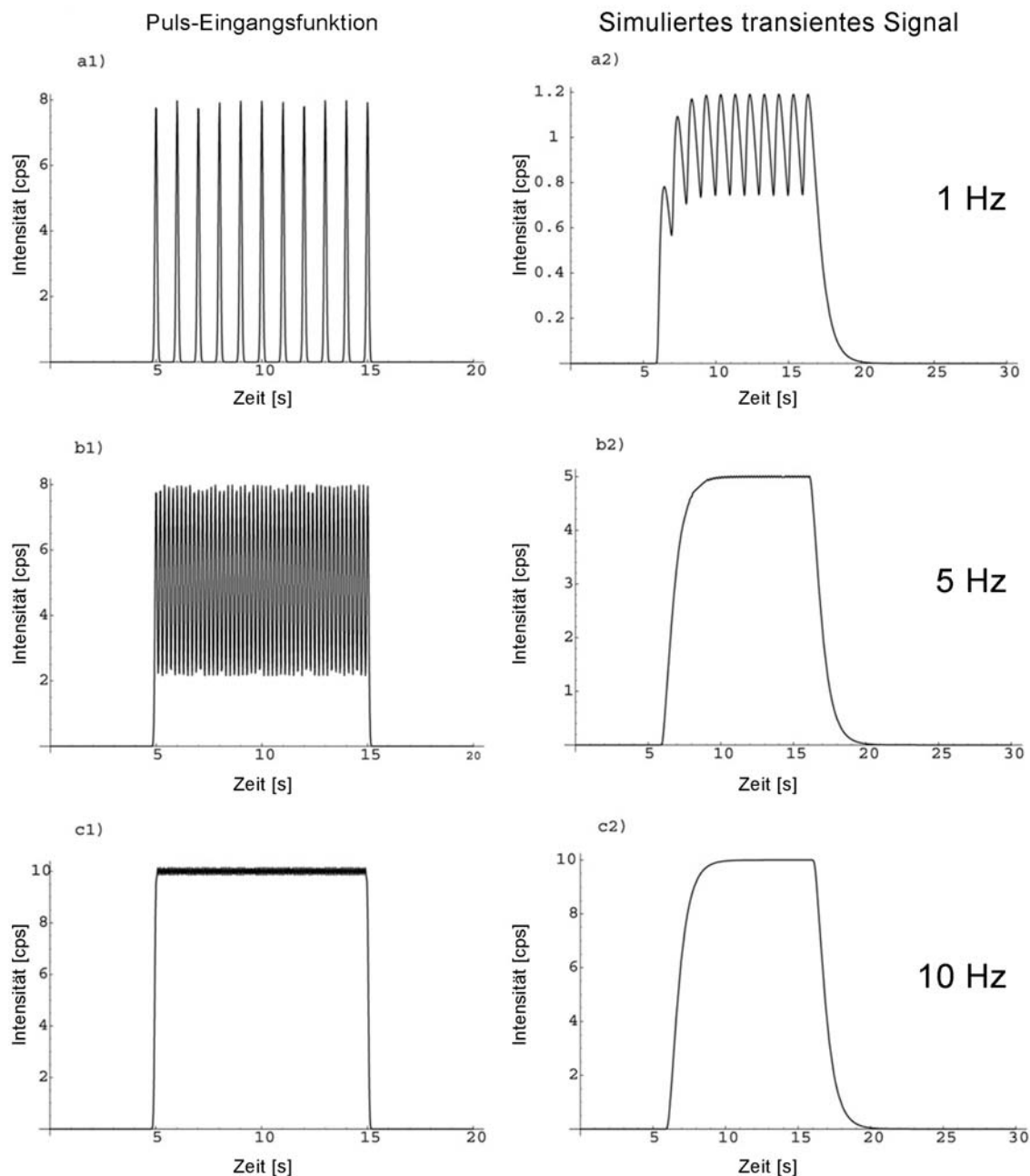
Da durch die Verwendung der Kollisions- und Reaktionszellentechnologie bei typischen Parametern die Signalintensität ungestörter Isotope abnimmt<sup>[108]</sup> (der Erfahrung nach um ca. 3 Größenordnungen), steigen die Nachweisgrenzen im Gegenzug weiter um den gleichen Betrag. Sie liegen also im oberen µg/g Bereich. Das heißt, dass nur eine Untersuchung der Haupt- und Nebenbestandteile sinnvoll durchzuführen ist. Für die Analyse von Spuren- und Ultraspurenbestandteilen hingegen ist die Verwendung der Kollisions- und Reaktionszellentechnologie in der LA-ICP-MS nicht mehr anwendbar. Allerdings finden sich bei der LA-ICP-MS gegenüber der ICP-MS mit Flüssigkeitsaufgabe nur rund ein Zehntel der polyatomaren oxidbasierten Interferenzen<sup>[103]</sup>, da es sich um sog. trockene Plasmabedingungen handelt. Es ist also wesentlich weniger Sauerstoff vorhanden und die Messungen werden nach gründlichem Spülen der Ablationkammer von vornherein wesentlich weniger gestört.

#### **2.1.5.5 Einfluss der Schussfrequenz auf die Signalform**

Grundsätzlich gibt es mehrere Möglichkeiten eine Probe mittels LA-ICP-MS zu untersuchen. Zu diesen gehören Tiefenprofilscans, Einzelschussuntersuchungen, Linienscans und zweidimensionale Untersuchungen ganzer Flächen.

Während bei der Einzelschussuntersuchung das Elementsignal für jeden Schuss einzeln integrierbar sein muss, so verwenden die restlichen Untersuchungstypen immer eine Serie von Laserpulsen, die nach einer kurzen Einwaschzeit ein quasistationäres zeitaufgelöstes Elementsignal ergeben. Wichtigstes Kriterium zum Erhalt eines stabilen quasistationären Elementsignals ist die Schussfrequenz der Laserpulse. Bleiner hat 2006 in einem Computermodell zur Simulation von LA-ICP-MS-Signalen (Abb. 16) gezeigt, dass zur Erreichung stabiler quasistationärer

Elementsignale eine Schussfrequenz von größer 5 Hz (besser 10 Hz) notwendig ist<sup>[93]</sup>.



**Abb. 16:** Simulationen des Elementsignals bei unterschiedlichen Schussfrequenzen (rechts) und deren Puls-Eingangsfunktionen (links)<sup>[93]</sup>

Höhere Schussfrequenzen ermöglichen zwar im Falle von Tiefenprofilscans die schnellere Untersuchung einer Probe, jedoch geht dies auf Kosten des Auflösungsvermögens, da sich das Aerosol der einzelnen Schüsse auf dem Weg zum ICP-MS durch Diffusion und das Strömungsprofil miteinander vermischt<sup>[91]</sup>. Im

Fall von einzelnen Linienscans oder zweidimensionalen Untersuchungen durch eine Serie von parallelen Linienscans wird die Auflösung im Wesentlichen durch den Probenvorschub der XYZ-Bühne unter dem Laser bestimmt. Eine höhere Schussfrequenz bewirkt in diesem Fall lediglich einen tieferen Abtrag der Probe.

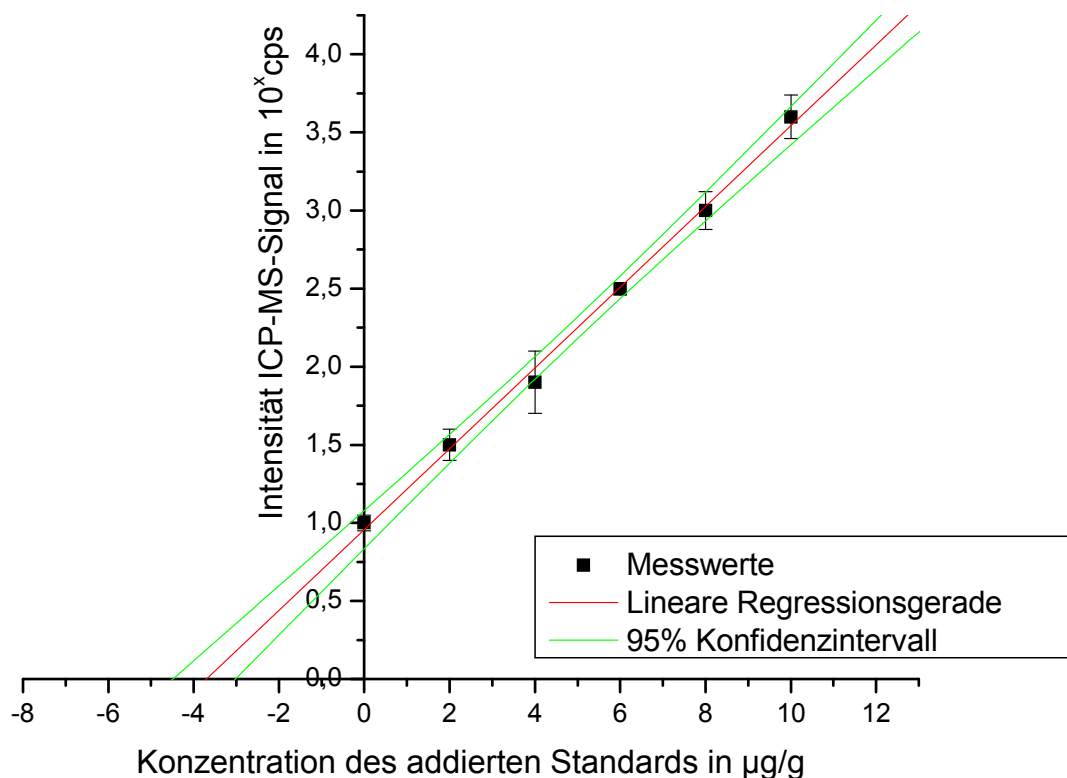
Ein Nachteil einer hohen Schussfrequenz ( $\gg 10$  Hz) ist, dass sich das gebildete Aerosol nicht schnell genug vom Ablationsort entfernen kann, bevor der nächste Laserpuls auf die Probe trifft. Als Konsequenz hieraus ergibt sich, dass die Energie, die durch den Laser auf die Oberfläche übertragen wird, durch Eigenabsorption des Aerosols stark verringert wird und großen Schwankungen unterliegt. Auch kann die Umgebung um den Ablationsort vom Plasma verändert werden (siehe Kapitel 2.1.3.1.1). Eine Erhöhung der Schussfrequenz über das nötige Maß zum Erhalt eines stabilen quasistationären Elementsignals ist also nicht empfehlenswert.

## **2.2      *Quantifizierung der LA-ICP-MS***

### **2.2.1      Quantifizierung durch das Verfahren der Standardaddition**

Eine wesentliche Schwierigkeit der Laser-Ablation-ICP-MS besteht in der absoluten Quantifizierung von Elementkonzentrationen.

Die Laser-Ablation an sich ist geprägt von einer hohen Matrixabhängigkeit. Die in der analytischen Chemie übliche Herangehensweise, um eine zutreffende Quantifizierung unter solchen Umständen zu erreichen, ist die Verwendung des Ansatzes der Standardaddition<sup>[99]</sup>.



**Abb. 17: Skizze zur Erklärung des Prinzips der Standardaddition**

Beim Quantifizierungsverfahren der Standardaddition werden Aliquote der Probe neben einem Blank um verschiedene, bekannte Konzentrationen eines oder mehrerer Standards aufgestockt und homogenisiert. Die eigentliche Matrix der Probe darf hierdurch nicht verändert werden, d. h. die Probe darf durch den Zusatz nicht wesentlich verdünnt werden. Nach der Analyse dieser Kalibrationsproben werden deren gemessene Intensitäten gegen die jeweilig aufgestockte Konzentration der Probe aufgetragen (Abb. 17). Die Probe, die nur mit einem Blank aufgestockt wurde, bildet hierbei den Y-Achsenabschnitt. Durch lineare Regression lässt sich eine Ausgleichsgerade bilden. Die verlängerte Ausgleichsgerade schneidet im Negativen die X-Achsen. Der Betrag des hier abzulesenden Wertes entspricht der Konzentration des Analyten in der nicht aufgestockten Probe. Besonders gute Resultate liefert diese Methode, wenn die Aufstockungen im Konzentrationsbereich wenig höher oder gleich der Realkonzentration in der Probe liegen<sup>[101]</sup>. Bei zu gering konzentrierten Aufstockungen wird das Ergebnis durch die erhöhte Unsicherheit der Kalibrationsgerade ungenau, bei zu hohen Aufstockungen steigt die absolute

Unsicherheit der Kalibrationsgerade wegen des größer werdenden Abstands zum letzten Messpunkt (Blank) stark an<sup>[101]</sup>.

Bei der praktischen Umsetzung dieser Kalibrationsstrategie ergibt sich für die LA-ICP-MS jedoch eine wesentliche Schwierigkeit: Es handelt sich bei dieser um eine Untersuchungsmethode zur direkten Feststoffanalyse und damit ist bei der Herstellung von matrixangepassten Kalibrationsproben die Einbringung des Standards oft mit Problemen behaftet oder sogar unmöglich. Diese Strategie lässt sich also nur in Ausnahmefällen anwenden.

### **2.2.2 Matrixangepasste Kalibration mittels Standardreferenzmaterialien**

Für einige wenige Matrices und Anwendungen sind Standardreferenzmaterialien verfügbar, die eine matrixangepasste Kalibration ermöglichen und auch gute Ergebnisse liefern. Ein Beispiel hierfür ist die Elementbestimmung in Gläsern durch die Verwendung der weit verbreiteten Standardreferenzmaterialien NIST 610 und NIST 612 <sup>[110,111]</sup> (bestimmte Elementkonzentrationen in einer Glas-Matrix). Der Einsatz von Standardreferenzmaterialien, die nicht der Probenmatrix entsprechen, liefert erwartungsgemäß auf Grund der hohen Matrixabhängigkeit der LA-ICP-MS nur unbrauchbare Ergebnisse<sup>[112]</sup>.

Für die meisten Matrices sind keine matrixangepassten, zertifizierten Standardreferenzmaterialien verfügbar. Da deren Herstellung und Validierung sehr aufwendig und kostenintensiv ist, dienen sie im Allgemeinen nur der Überprüfung einer Quantifizierungsmethode und nicht der eigentlichen Kalibration an sich. Auch werden für eine valide Kalibration mehrere Standards verschiedener Konzentrationen in etwa der Größenordnung der Probe benötigt.

Der Umstand der mangelhaften Verfügbarkeit von matrixangepassten, zertifizierten Standardreferenzmaterialien hat zu zahlreichen Versuchen geführt, andere teilweise bewährte Kalibrationsstrategien zu erproben.

### 2.2.3 Kalibration mittels zerstäubter Standardlösungen

Die Verwendung einer über Nebulizer zugegebenen Standardlösung oder einer Verdünnungsreihe von Standardlösungen zum Laser generierten Feststoffaerosol zu Kalibrationszwecken wurde zwar veröffentlicht<sup>[113]</sup>, ist aber nicht ohne weiteres möglich. Der Grund hierfür liegt darin, dass der Ablationsprozess an sich stark von der Matrix abhängig ist. Ebenfalls lässt diese Methode vollkommen außen vor, wieviel Aerosol durch die Laser-Ablation produziert wird und zum Analysator gelangt, was einen direkten Einfluss auf die Signalintensität hat. Unter konstanten Ablationsbedingungen kann diese Methode nur eine relative, sekundäre Kalibration ermöglichen. Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass dieser Ansatz die Plasmabedingungen hin zu einem feuchten Plasma ändert. Hierdurch werden oxidbasierte polyatomare Interferenzen erzeugt, die nur durch Hochauflösung oder Verwendung der Kollisionszellentechnologie beseitigt werden können. Der letzte Fall ist aber - wie bereits in Kapitel 2.1.5.4, S. 31 beschrieben - , nur bedingt auf die Laser-Ablationsanalytik mittels Quadrupol-ICP-MS anwendbar, da auf Grund des Intensitätsverlustes nur noch die Haupt- und Nebenbestandteile, nicht aber mehr die Spuren bestimmt werden können.

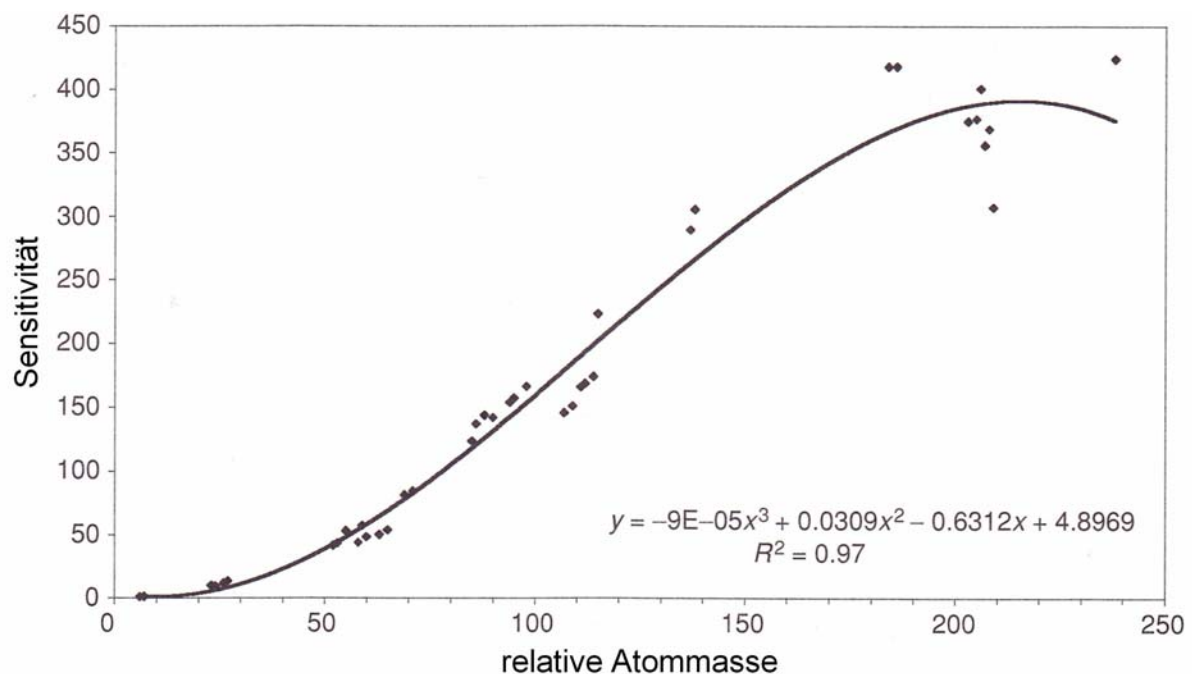
Eine verwandte, verbesserte Strategie zur Quantifizierung wurde von Leach und Allen<sup>[114]</sup> entwickelt. Sie benutzen einen Nebulizer mit nachgeschaltetem Verdampfer, in dem das feuchte Aerosol des Nebulizers durch Wasserabscheidung in ein trockenes verwandelt wird. Durch einzelne und gemeinsame Messung der Signale der beiden Stoffströme (des Ablationsaerosols und des getrockneten Nebulizeraerosols) kann nun quantifiziert werden. Allerdings müssen hierzu die einzelnen Massenströme gemessen werden, was insbesondere von der Laser-Ablationsseite die Methode stark verkompliziert. Kurzfristige Schwankungen in der Ablation sind hierbei nicht zu korrigieren. Es sei denn durch die zusätzliche Installation einer speziellen Zelle zur zeitaufgelösten Messung der Massenströme, wie sie Watling 1998 vorschlug<sup>[115]</sup>.

## 2.2.4 Nicht matrixangepasste feste Kalibrationsstandards

Die Verwendung nicht matrixangepasster, fester Kalibrationsstandards wurde ebenfalls diskutiert<sup>[116,117]</sup>. Hierzu ist eine Bestimmung von matrix- und elementspezifischen Umrechnungsfaktoren zwischen Probensignal und Kalibrationssignal notwendig. Die Bestimmung solcher Faktoren ist jedoch mit einem erheblichen Mehraufwand verbunden und muss bei jeder Neueinstellung der Analysenparameter wiederholt werden.

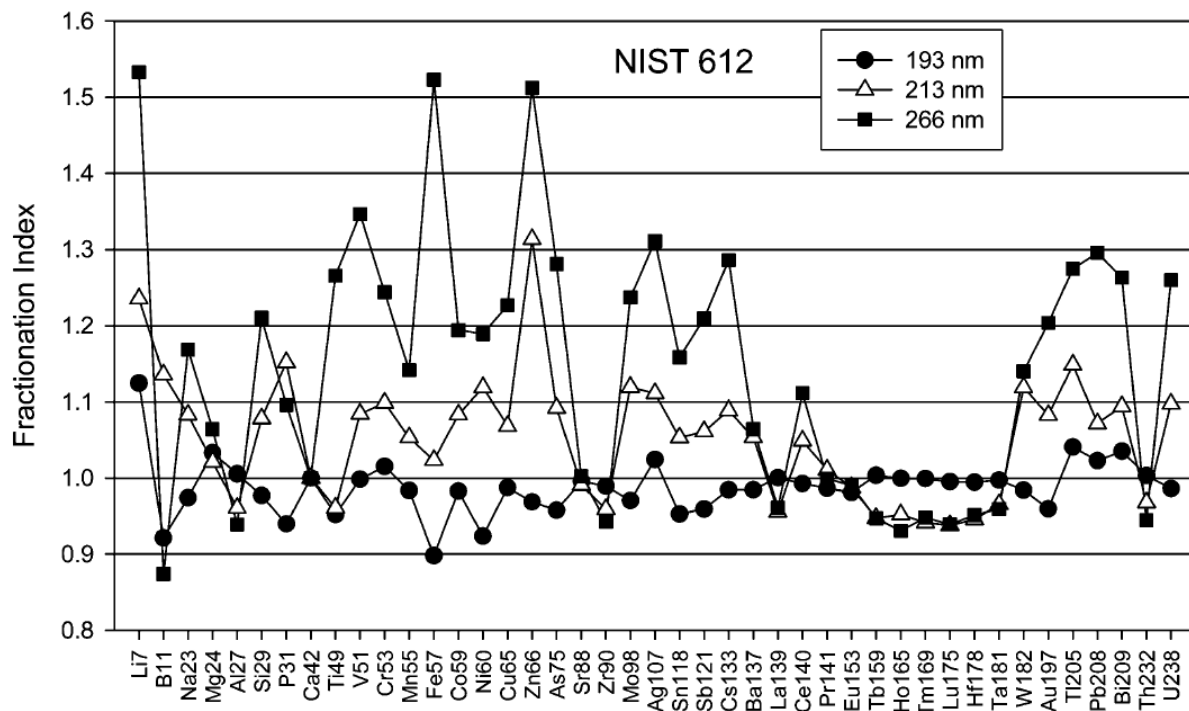
## 2.2.5 Semiquantitative Analyse

Die einfache semiquantitative Analyse<sup>[78]</sup> kann bei der LA-ICP-MS nicht ohne weiteres angewandt werden. Die hierbei benutzten Faktoren zur Umrechnung zwischen den Sensitivitäten verschiedener Elemente berechnen sich aus einem Polynomfit dritten Grades aus der Auftragung des Atomgewichts gegen die Sensitivität (siehe Abb. 18).



**Abb. 18:** Polynom dritten Grades der Sensitivität eines Elan 5000 ICP-MS basierend auf der Messung von 40 Elementen (zwischen  $^6\text{Li}$  und  $^{238}\text{U}$ ); Einheit der Sensitivität ist  $10^{-11} \text{ counts} / (\text{s} \cdot \text{Atomanzahl} \cdot \text{g Lösung})$ <sup>[100]</sup>

Bei der LA-ICP-MS treten teils starke Fraktionierungseffekte auf. So unterscheiden sich verschiedene, auch benachbarte Elemente stark in ihrem Ablationsverhalten voneinander. Aus diesem Grund müssen für die Anwendung der semiquantitativen Analyse zusätzlich elementabhängige Fraktionierungsindizes berücksichtigt werden. Diese hängen jedoch stark von den verwendeten Geräteparametern und der Matrix ab (Abb. 19) und sind nur schwierig zu bestimmen.



**Abb. 19:** Exemplarische Fraktionierungsindizes der LA-ICP-MS bei der Analyse des Standardreferenzmaterials NIST 612 mit verschiedenen UV-Laserwellenlängen (193 nm, 213 nm und 266 nm) bezogen auf  $^{42}\text{Ca}^{[65]}$

Eine semiquantitative Analyse besitzt von sich aus eine Unsicherheit von 30% bis 50% für nicht interferierte Elemente<sup>[100]</sup>. Daher ist sie höchstens für ein schnelles Elementscreening, nicht aber für eine genaue Quantifizierung einer Probe geeignet. Dieser Vorteil der Schnelligkeit wird allerdings bei der LA-ICP-MS durch die Notwendigkeit der Bestimmung der Fraktionierungsindizes zunichte gemacht.



### **2.2.6 Kalibration durch simultane Analyse gestapelter Proben- und Standardschicht**

Ein neuer Ansatz<sup>[118]</sup> bei der Untersuchung dünner Schichten mittels LA-ICP-MS ist die Einbringung eines Standards direkt unter der Probenschicht und deren gemeinsame Ablation zusammen mit der Probe. Hierbei müssen die Ablationsparameter derart gewählt werden, dass beide Schichten vollständig abliert werden. Desweiteren müssen die Schichtdicken der Probe wie auch der Standardschicht sowie die Elementkonzentration in der Standardschicht bekannt sein. Um einen zu hohen Fehler zu vermeiden, muss die Konzentration des Standards in der gleichen Größenordnung sein wie die Konzentration in der Probe. Die Schichtdicken dürfen im Vergleich zum Laserstrahldurchmesser nur klein sein, da sonst eine ähnlichgroße Ablation der Standardschicht gegenüber der aufliegenden Probenschicht nicht mehr gewährleistet ist. Diese Methode liefert aber nur eine Ein-Punkt-Standardadditionskalibration, es sei denn dieselbe Probe wird mit verschiedenen, bekannten Konzentrationen unterschichtet.

### **2.2.7 Matrixunabhängige Kalibration mittels optimaler Ablationsparameter**

Eine vielversprechende, allgemein anwendbare Methode zur Lösung des Kalibrationsproblems der LA-ICP-MS liegt in der Verwendung von UV-fs-Lasern<sup>[46,47,85]</sup>. Die Kombination der kurzen Wellenlänge mit der kurzen Pulsdauer ergibt eine stark verringerte Matrixabhängigkeit<sup>[119]</sup>, so dass eine weitgehend matrixunabhängige Kalibration möglich wird<sup>[120]</sup>. In der aktuellen Entwicklung dieses Ansatzes geht der Trend von 266 nm<sup>[46,121]</sup>, zu immer kürzeren Wellenlängen, wobei im Moment 196 nm erprobt werden<sup>[122]</sup>. Ein Ende dieser Entwicklung scheint noch nicht in Sicht, da die Resultate immer noch größere Fehler aufweisen, als sie bei der direkten Analyse von zerstäubten Flüssigkeiten über die ICP-MS auftreten.

Ein weiterer, wesentlicher Nachteil dieses Ansatzes besteht allerdings in den Kosten und der Handhabung von UV-fs-Laser, da Femtosekunden-Laser im Allgemeinen extrem kostenintensiv ( $>10^6$  Euro) sind und kürzere UV-Wellenlängen bei Lasern nicht trivial handzuhaben sind. So müssen bei Wellenlängen kürzer als 200 nm beispielsweise spezielle Linsenmaterialien verwendet werden und der

Eigenabsorption von Luft Rechnung getragen werden, indem der Strahlengang mit einem nicht absorbierenden Gas geflutet wird<sup>[68]</sup>.

## 2.2.8 Interne Standardisierung

Die Methode der internen Standardisierung<sup>[123]</sup> ist bei der Analytik von nicht homogenisierten, festen Proben nur in bestimmten Fällen anzuwenden, denn nur selten besteht die Möglichkeit, den Standard in die Probe an sich einzubringen.

Die oben beschriebene Technik, einen Standard direkt unter der Probe einzubringen und ihn gleichzeitig mit der Probe zu ablieren, ermöglicht ebenfalls die Einbringung eines internen Standards. Wenn beide Signale möglichst simultan aufgenommen werden, können in diesem Fall Unregelmäßigkeiten der Ablation oder Schwankungen der Plasmabedingungen<sup>[100]</sup> durch Quotientenbildung korrigiert werden. Im erwähnten Fall müssen die Schichtdicken des Standards und der Probe aber extrem gleichmäßig sein, da eine Korrektur über die interne Standardisierung ansonsten zu einer Vergrößerung des Fehlers führen würde.

Die interne Standardisierung kann ebenfalls bei der Untersuchung von Pulverpresslingen angewandt werden<sup>[124]</sup>, da der interne Standard zum Pulver bei nicht allzu großer Verdünnung hinzuaddiert werden kann. Kritisch ist hier jedoch die Homogenisierung des Standards in der Probe, was wieder einen erhöhten Aufwand in der Probenvorbereitung und somit ein Kontaminationsrisiko mit sich bringt.

## 2.3 *Biologische Gewebe*

### 2.3.1 Elemente in Geweben

#### 2.3.1.1 Vorkommen

Die Anzahl der in allen Lebewesen natürlich vorkommenden Elemente lässt sich auf ungefähr 20 beschränken, obwohl das Periodensystem der Elemente (PSE) eine wesentlich größere Anzahl an Elementen umfasst.

Elf Elemente hiervon kommen als absolut essentiell in allen biologischen Systemen immer in annähernd gleichen Konzentrationen vor. Beim Menschen machen sie mehr als 99,9 % des Gesamtstoffmengenanteils aller im Körper enthaltener Atome aus<sup>[1]</sup>: Diese sind neben Wasserstoff (H), Sauerstoff (O), Kohlenstoff (C) und Stickstoff (N),

die alleine schon 99 % des Stoffmengenanteils ausmachen (vgl. Tabelle 1), die Elemente Natrium (Na), Kalium (K), Calcium (Ca), Magnesium (Mg), Phosphor (P), Schwefel (S) und Chlor (Cl).




**Tabelle 1: Hauptelemente im menschlichen Körper<sup>[1]</sup>**

Element	Stoffmengenanteil (Anzahl der Atome)
Wasserstoff (H)	62,8 %
Sauerstoff (O)	25,4 %
Kohlenstoff (C)	9,4 %
Stickstoff (N)	1,4 %
Rest	1,0 %

Desweiteren gibt es zehn Elemente, die für die meisten aber nicht alle biologischen Systeme als essentiell angenommen werden. Zu ihnen zählen Mangan (Mn), Eisen (Fe), Cobalt (Co), Nickel (Ni), Kupfer (Cu), Zink (Zn), Molybdän (Mo), Bor (B), Silicium (Si) sowie Selen (Se). Einen Überblick über die essentiellen Elemente bietet Abb. 20.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
(H)																	He
Li	Be											B	(C)	(N)	(O)	F	Ne
(Na)	(Mg)											Al	(Si)	(P)	(S)	(Cl)	Ar
(K)	(Ca)	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	(Sr)	Y	Zr	Nb	(Mo)	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	(Cd)	In	(Sn)	Sb	Te	I	Xe
Cs	(Ba)	Ln	Hf	Ta	(W)	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	Ac	Th	Pa	U												

 Hauptelemente aller Lebewesen	 Essentielle Spurenelemente für Bakterien, Pflanzen oder Tiere	 Wahrscheinlich essentiell für einige Spezies
---	---	--

**Abb. 20: PSE der essentiellen Elemente<sup>[1]</sup>**

Nur in Pflanzen und Tieren als essentiell angesehen werden noch acht weitere, von denen bei einigen nicht ganz klar ist, ob sie wirklich als essentiell anzusehen sind (siehe „?“): Vanadium (V), Chrom (Cr), Fluor (F), Iod (I), Arsen (As)(?), Brom (Br)(?), Zinn (Sn)(?) und Wolfram (W).

Daneben gibt es aber auch Organismen, die bestimmte Elemente anreichern, obwohl sie als nicht essentiell in ihrem Stoffwechsel bekannt sind (beispielsweise die Arsenanreicherung in Braunalgen).

Da einer Anzahl von weit über einer Million bekannter Organismen nur wenige hundert Studien über die Essentialität von Elementen gegenüber stehen, zeichnet sich zwar ein immer schärfer werdendes Bild ab, aber es können nicht alle Fragen hierüber abschließend geklärt werden, da Essentialitätsstudien durch ein hohes Kontaminationsrisiko oft schwierig durchzuführen sind und die Konzentrationsbereiche, in denen manche Elemente essentiell vorkommen könnten, auch an die Nachweisgrenzen der Analytik stoßen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich die für die Chemie des Lebens wichtigen Elemente (sowohl Metalle als auch Nichtmetalle) mit wenigen Ausnahmen auf solche mit Ordnungszahlen kleiner als 36 (Krypton (Kr)) beschränken. Diese kommen aus allen Haupt- und Nebengruppen des PSE (mit Ausnahme der Gruppen 3 und 4 sowie der Edelgase), womit alle chemischen Eigenschaften mit Prozessen des Lebens verknüpft sind.

### **2.3.1.2 Einteilung der Elemente**

Auf Grund des hohen Wasseranteils in den Körpern aller Lebewesen ist die Chemie des Lebens meist reine Wasserchemie, d.h. mögliche Reaktionen müssen in wässrigem Medium stattfinden und sind allein schon auf Grund des Lösungsmittels auf einen Redoxpotential- und pH-, sowie Temperaturbereich beschränkt<sup>[1]</sup>.

Elementare Metalle und Legierungen können nicht in biologische Systeme aufgenommen werden, auch sind viele Metalle nicht in ihrer gelösten Form stabil und sind somit nicht biologisch verfügbar. Prozesse, die elektrischer Leitfähigkeit bedürfen, wie beispielsweise die Weiterleitung von Nervenimpulsen, müssen

anderweitig bewerkstelligt werden, da sie nicht auf die metallische Leitfähigkeit zurückgreifen können.

Vorgänge, die in der heutigen Industrie eines enormen Energieaufwands bedürfen, müssen biologische Systeme unter Umweltbedingungen zustande bringen. Dies wird durch die Verwendung von extrem gut angepassten katalytischen Prozessen erreicht, die oft über eine Million Jahre evolutionärer Entwicklungszeit hinter sich haben.

Die meisten Nichtmetalle (S, P, Si, F, Cl, I, Se sowie zusätzlich Mo) tendieren in wässrigem Medium dazu als anionische Spezies vorzukommen, während Metalle grundsätzlich als Kationen vorliegen.

Elemente in biologischen Systemen können nach ihrer bevorzugten Beteiligung an Reaktionen grundsätzlich in vier Gruppen eingeteilt werden, wobei die Grenzen nicht immer ganz klar gezogen werden können: <sup>[1]</sup>

### **1.) Die Elemente der ersten und zweiten Hauptgruppe sowie Halogenide**

Sie sind hauptsächlich verantwortlich für wässrige Ionenchemie im Gleichgewicht.

### **2.) Die Übergangsmetalle**

Sie sind generell zwar auch für Ionenchemie im Gleichgewicht bekannt, jedoch zeigt sich über die Schale eine Zunahme des kovalenten Charakters ihrer Chemie sowie der Lewis-Säure-Stärke, die nicht notwendigerweise mit ihrer Umgebung im Gleichgewicht stehen muss. In der Biologie kommen Übergangsmetalle deshalb hauptsächlich als Komplex an organischen Biomolekülen gebunden vor, die als Liganden fungieren. Sie sind wegen ihrer Fähigkeit zwischen mehreren Oxidationszuständen wechseln zu können, stark in Prozessen der Oxidation und Reduktion involviert.

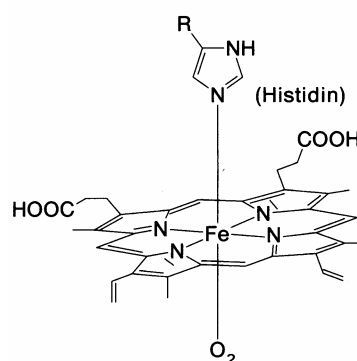
### **3.) Übergangsmetallionen der Gruppe 12**

Sie sind starke Lewis-Säuren, haben allerdings nur eine schwache bis gar keine Redoxaktivität, was ihnen eine Zwischenrolle zwischen den Übergangsmetallen und den Nichtmetallen einräumt.

#### 4.) Die Nichtmetalle (H, C, N, O, P, S)

Durch ihren kovalenten Charakter sind sie für den Aufbau von Biopolymeren aller Art (Proteine, DNA, RNA, Enzyme, Zellmembranen etc.) verantwortlich. Durch sie finden sowohl die kinetische Kontrolle der Redoxreaktionen der Übergangsmetallkomplexe als auch Säure-Base-Reaktionen statt, da bei ihnen der Lewis-Base-Charakter überwiegt.

Die individuellen Eigenschaften der einzelnen Elemente haben in der Evolution dazu geführt, dass in den höheren Spezies bestimmte Elemente immer stärker spezifizierte Funktionen erfüllen, die trotz im groben ähnlicher Eigenschaften nicht mehr von anderen Elementen übernommen werden können. Als ein Beispiel kann hier das im Hämoglobin enthaltene Eisen dienen (Abb. 21), dass in fast allen Lebewesen für den internen Transport des Sauerstoffs zuständig ist.



**Abb. 21:** Das im Porphyrinring komplexierte Eisen (Häm) dient im Hämoglobin zur reversiblen Bindung von Sauerstoff

#### 2.3.2 Die Leber

Die Leber ist das größte und funktionell vielfältigste Organ eines jeden Wirbeltierkörpers. Sie spielt bei der Aufrechterhaltung der Körperfunktionen, der sog. Homöostase, eine wesentliche Rolle. Zu ihren fünf Hauptaufgaben gehören Synthese, Speicherung, Umwandlung, Recycling und Entgiftung<sup>[15]</sup>.

In ihrer Synthesefunktion stellt die Leber verschiedenartigste Stoffe her, deren wichtigste Vertreter im Folgenden kurz vorgestellt werden.

Die Leber liefert stickstoffhaltige Abfallprodukte wie Ammoniak, Harnstoff und Harnsäure, welche die Exkretion, die Elimination von vom Körper nicht mehr benötigter oder giftiger Stoffe, durch die Niere unterstützen. Hergestellt werden auch Proteine des Blutplasmas (wie Serumalbumin oder das für die Blutgerinnung wichtige Fibrinogen), Wachstumsfaktoren und die Gallenflüssigkeit. Letztere gelangt über ein eigenes Gefäßsystem zur Gallenblase, wo sie bis zur Verwendung gespeichert wird, und anschließend im Darm zur Aufnahme von Fett aus der Nahrung beiträgt. Insgesamt stellt die Leber damit die größte Drüse des Wirbeltierkörpers dar.

Daneben synthetisiert die Leber noch Cholesterin, Lipoproteine, Phosphatide, Ketonkörper und bei manchen Wirbeltieren Gefrierschutzstoffe.

Neben der Synthese dient die Leber auch als Speicherorgan für lipophile Vitamine (z.B. Vitamin A), Eisen, Glycogen und Hormone, sowie auf Grund der hohen Durchblutung für Blut.

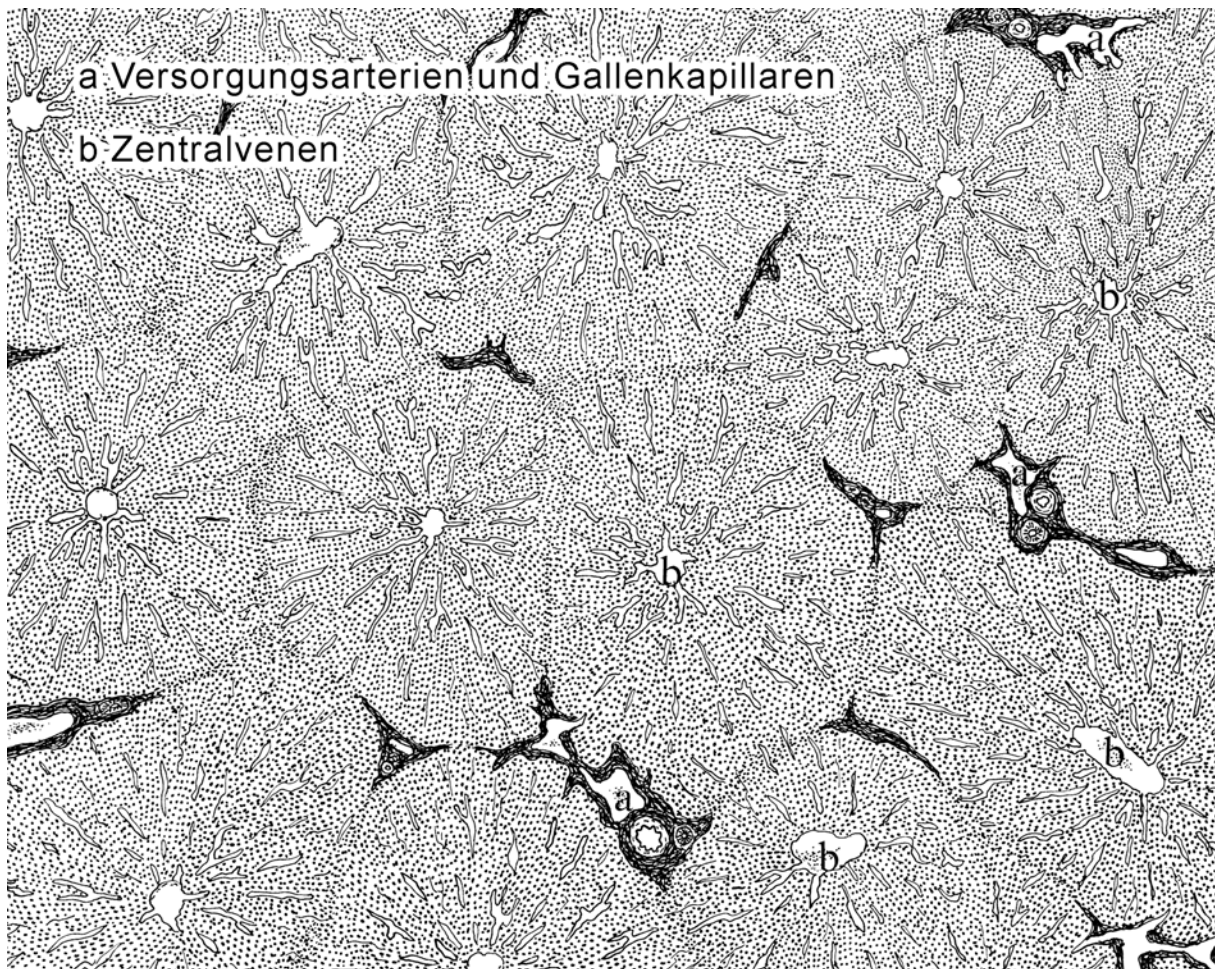
Als Umwandlungsorgan ist die Leber fähig, aus Kohlehydraten Fett zu synthetisieren, welches an anderer Stelle gespeichert werden kann. Aus Glukose und Lactat stellt sie Glycogen als hochmolekulare Speicherform der Glukose her und kann diese bei Bedarf in Glukose zurückverwandeln.

Die Leber ist verantwortlich für den Abbau gealterter roter Blutkörperchen (Erythrozyten). Die dabei freiwerdenden Komponenten wie Proteine und Eisen-Ionen können zum Teil weiterverwendet werden, da die Leber sie recycelt.

Desweiteren ist die Leber das zentrale Entgiftungsorgan von Wirbeltieren. Sie ist in der Lage viele lipophile Giftstoffe (z. B. Alkohol oder Barbiturate) durch Oxidation in hydrophile umzuwandeln, so dass diese über die Niere aus dem Körper eliminiert werden können und der Körper dadurch detoxifiziert wird.

Diese enorme Stoffwechselleistung trägt dazu bei, dass die Leber beim Menschen auch eine der größten Wärmequellen darstellt.

Betrachtet man einen Schnitt durch die menschliche Leber, so ist festzustellen, dass das Gewebe wenig differenziert ist und optisch homogen wirkt<sup>[125]</sup>.



**Abb. 22: Leberläppchen humaner Leber bei 40facher Vergrößerung<sup>[125]</sup>**

Erst bei näherer Betrachtung fällt auf, dass das Gewebe morphologisch in 1 bis 2 mm große, meist polygonale Leberläppchen (Lobuli) aufgeteilt ist<sup>[126]</sup>. In der Mitte der Läppchen verlaufen die Zentralvenen, die venöses nährstoffreiches Blut vom Dünndarm zu den Leberzellen befördern. Zur Energieversorgung der Leberzellen existiert noch ein zweites Kapillarnetz, das arterielles Blut heranzuführt. Dessen Adern durchdringen die Leber an den Stoßkanten von drei oder mehr Leberläppchen. Parallel hierzu führen die Gallenkapillaren, welche die Gallenflüssigkeit zur Gallenblase transportieren. Die Leberzellen innerhalb der Läppchen sind nicht weiter spezifiziert, so dass sich ein recht homogenes Gesamtbild ergibt.



## 2.4 Zellenkulturen

### 2.4.1 Der Zellzyklus

Jeder mehrzellige Organismus geht in seiner Entwicklung einmal aus einer einzigen Zelle hervor. Dabei findet eine Vielzahl von Zellteilungen statt, bis der Organismus ausgewachsen ist. Auch nach Beendigung des Wachstums finden Zellteilungen statt, zum Beispiel beim Heilen von Wunden oder beim Ersetzen defekter Zellen<sup>[127]</sup>.

Jede einzelne somatische Zelle (alle Zellen außer den Keimzellen) eines Eukarionten durchläuft in mehr oder weniger großer Geschwindigkeit einen Zellzyklus, der aus zwei großen Phasen, der Interphase und der Mitosephase besteht.

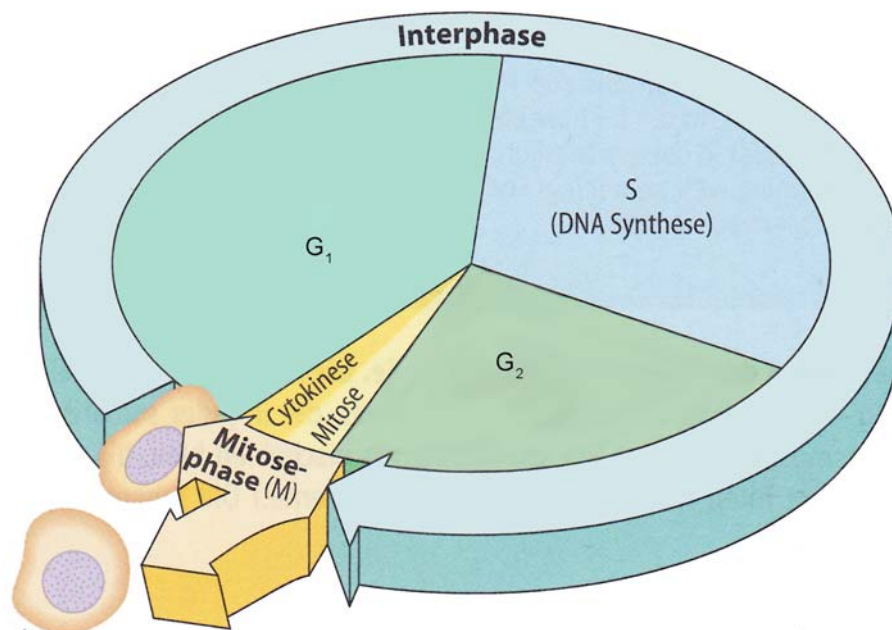


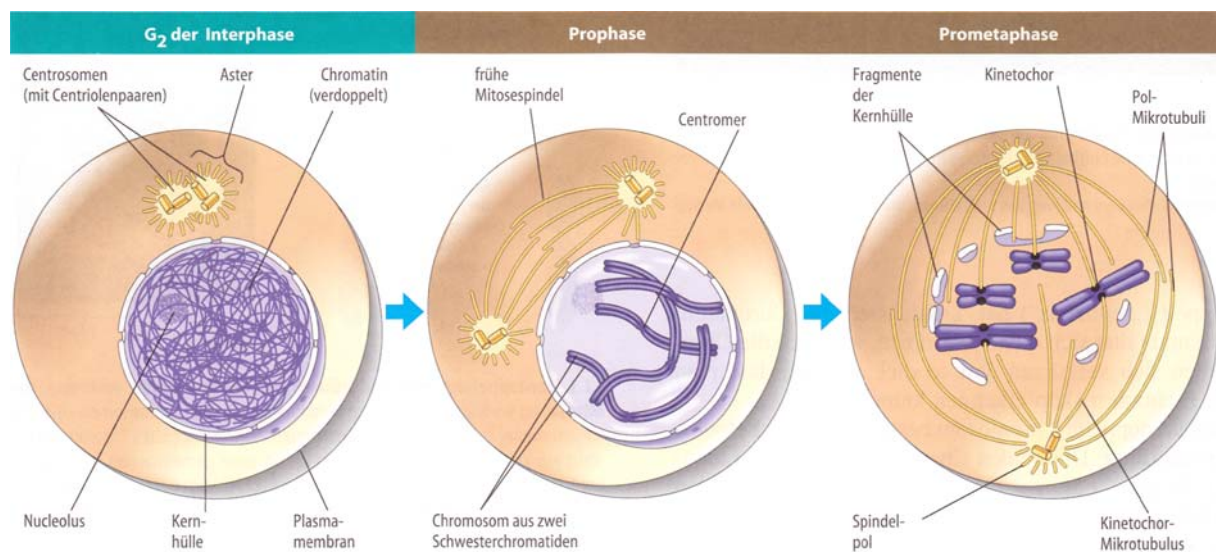
Abb. 23: Phasen des Zellzyklus<sup>[127]</sup>

In der Interphase, die zeitlich häufig rund 90% des ganzen Zellzyklus ausmacht,<sup>[127]</sup> wächst die Zelle, bildet Proteine und cytoplasmatische Organellen aus, kommt ihrer spezifischen metabolischen Funktion nach und trifft Vorbereitungen auf die Mitosephase<sup>[126]</sup>. Die Interphase unterteilt sich dabei in drei Unterphasen:

Erstens die G<sub>1</sub>-Phase (das G steht für gap (engl.: Lücke)), in welcher in der Zelle keine offensichtlichen Aktivitäten zur Vorbereitung auf die nächste Teilung stattfinden. In dieser Phase verweilen die Zellen am längsten; Nervenzellen sogar dauerhaft, da sie sich nach dem Auswachsen des Organismus nicht mehr teilen.

Zweitens die S-Phase (Synthese-Phase), in der neben den Aktivitäten, die in der G1-Phase stattfinden, die DNA verdoppelt wird. Diese Phase dauert meist nur wenige Stunden und ist eine bemerkenswerte Leistung der Natur, da beispielsweise die DNA eines Menschen, aufgeteilt auf 46 Moleküle, aneinandergereiht eine Länge von ca. zwei Metern besitzt.

Die dritte Phase wird als G2-Phase bezeichnet. In ihr werden die Vorbereitungen auf die Mitosephase, wie beispielsweise die Teilung der Centrosomen, abgeschlossen.



**Abb. 24: Phasen der Mitose (Teil I)** <sup>[127]</sup>

Die Mitosephase (kurz M-Phase genannt) besteht aus der Teilung des Zellkerns (Mitose) und der eigentlichen Teilung der Zelle (Cytokinese).

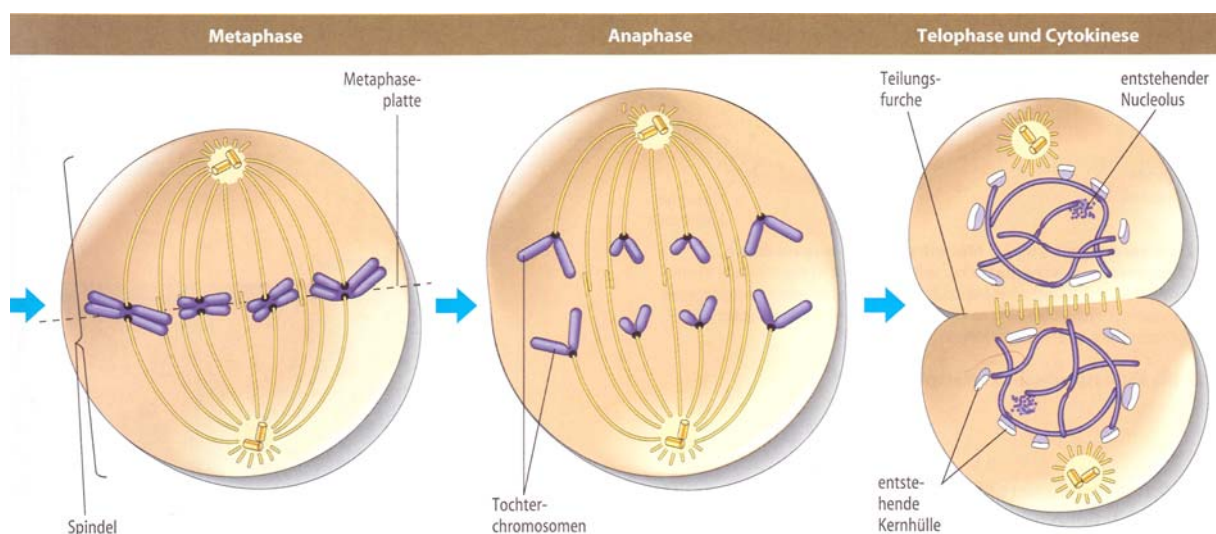
Der Vorgang der Mitose (Zellkernteilung) lässt sich im Idealfall in fünf Teilphasen (Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase) unterteilen und dauert meist eine bis zu mehrere Stunden, wobei ungefähr die Hälfte für Prophase und Prometaphase benötigt werden und Meta- sowie Anaphase nur einen Anteil von wenigen Minuten haben <sup>[126]</sup>.

In der Prophase bildet sich die sog. Mitosespindel (auch Spindelapparat genannt) aus, die während der weiteren Phasen der Mitose eine bedeutende Rolle bei der Verteilung des Erbguts auf die beiden sich neu bildenden Zellen spielt. Die Mitosespindel besteht aus zwei Knotenpunkten, den sog. Centrosomen, die sich zu Beginn der Prophase in der Nähe des Zellkerns befinden. Von diesen ausgehend bilden sich aus dem Protein Tubulin sog. Mikrotubuli aus. Treffen Mikrotubuli der

beiden Centrosomen zusammen, so werden sie bis zum Ende der Prometaphase durch das Motorprotein Kinesin diametral auf maximale Distanz auseinander geschoben.

Neben der Ausbildung der Mitosespindel kondensiert im Zellkern die verdoppelte DNA (Chromatin) in Form von Chromosomen, die unter dem Mikroskop sichtbar werden. Diese sind aus zwei Schwesterchromatiden aufgebaut, die jeweils dieselbe genetische Information enthalten und die über das Centromer miteinander verbunden sind und entlang der Chromosomenarme mittels Cohesinringen zusammengehalten werden. In diesem Zustand ist die DNA soweit komprimiert, dass genetische Informationen nicht mehr exprimiert werden können. Außerdem lösen sich die Nucleoli auf.

In der Prometaphase zerfällt die Kernhülle in Vesikel und die Mikrotubuli der beiden Centrosomen können in den Kern eindringen. Dort heften sie sich an das Centromer eines jeden Chromosoms, genauer an Stellen des Centromers, die Kinetochore genannt werden. Jedes Chromatid eines Chromosoms enthält genau ein Kinetochor. Die beiden Kinetochore eines Centromers weisen in entgegengesetzte Richtungen, so dass jedes Chromatid eines Chromosoms mit einem anderen Centrosom verbunden wird. Mikrotubuli, die keinen Kinetochor als Bindungspartner finden, verbinden sich mit den Entgegenkommenden des anderen Centromers. Nachdem beide Kinetochore eines Chromosoms eine Verbindung zu einem Mikrotubulus aufgebaut haben, beginnt die Verkürzung dieser am Centromer.



**Abb. 25: Phasen der Mitose (Teil II)** <sup>[127]</sup>

In der Metaphase sind alle Chromosomen genau in der Mitte zwischen beiden Zellpolen (Centrosomen) aufgereiht und bilden die sog. Metaphaseplatte.

Die Anaphase beginnt sehr plötzlich. Die Cohesine werden aufgelöst und die Centromere der Chromosomen teilen sich, so dass jedes Schwesterchromatid ab jetzt ein eigenständiges, vollständiges Tochterchromosom bildet. Die Mikrotubuli, mit denen sie verbunden sind, verkürzen sich, so dass die Tochterchromosomen mit einer Geschwindigkeit von ungefähr 1  $\mu\text{m}/\text{min}$  auseinander gezogen werden. Die Mikrotubuli, die eine Verbindung mit dem entgegenkommenden Centromer aufweisen, verlängern sich, so dass die Zellpole (Centrosomen) weiter auseinander rücken. Am Ende der Anaphase befindet sich an jedem Zellpol ein vollständiger Chromosomensatz.

In der letzten Phase der Mitose, der Telophase, bilden sich aus den Vesikeln um die jeweiligen Chromosomensätze Kernhüllen und es entstehen Tochterzellkerne. Innerhalb der neuen Zellkerne beginnen sich die Chromosomen zu entspiralisieren und neue Nucleoli werden gebildet. Während die Teilung des Zellkern (Mitose) in der Telophase zu Ende geht, hat in der Regel bereits die Teilung des Cytoplasmas (Cytokinese) begonnen, so dass die komplette Zellteilung kurz nach der Mitose abgeschlossen ist und beide Tochterzellen ihrer metabolischen Funktion nachkommen können.

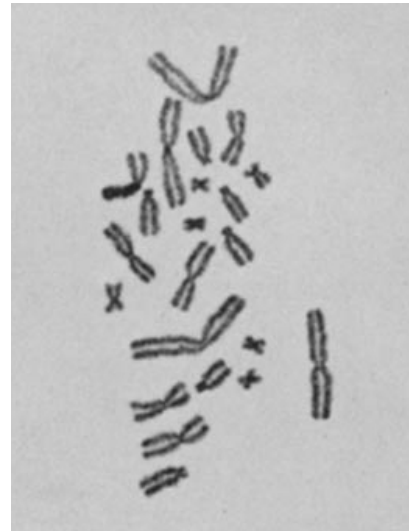
### 2.4.2 Die CHO-Zellen

Die aus den späten 50er Jahren stammenden<sup>[10]</sup> und heute weit verbreiteten Linien der Ovarienzellen des Chinesischen Hamsters (lat.: *Cricetulus griseus*; siehe Abb. 26) werden in der heutigen Bioforschung häufig als das Säugetieräquivalent zu Zellkulturen des Modellbakteriums *Escherichia coli* bezeichnet<sup>[11]</sup>.

Es handelt sich um robuste Zelllinien<sup>[12]</sup> mit einer kurzen Generationszeit von nur 12,4 h<sup>[13]</sup>, was entscheidend zu ihrer weiten Verbreitung beigetragen hat.



**Abb. 26: Chinesischer Hamster**  
(lat.: *Cricetulus griseus*)



**Abb. 27: Chromosomen ( $2n = 22$ ) des chinesischen Hamsters<sup>[128]</sup>**

Die Größe des Genoms des chinesischen Hamsters ist mit  $2,98 \cdot 10^9 \pm 0,48 \cdot 10^9$  Basenpaaren<sup>[129-133]</sup> typisch für einen Säuger (vgl. Mensch:  $3,08 \cdot 10^9$  Basenpaare<sup>[133]</sup>). Eine CHO-Zelle (engl.: chinese hamster ovary) verfügt verglichen mit dem Mensch ( $2n = 46$ )<sup>[126]</sup> oder einer Maus ( $2n = 40$ )<sup>[126]</sup> über eine sehr niedrige Anzahl ( $2n = 22$ )<sup>[128]</sup> an Chromosomen. Auch können die einzelnen Chromosomen anhand ihrer charakteristischen Form (sog. Karyotypheterogenität) voneinander unterschieden werden (vgl. Abb. 27).

Durch diese beiden Eigenschaften eignen sich CHO-Zellen ideal zur Untersuchung von Anomalien der Chromosomen (Chromosomenaberrationen)<sup>[12]</sup>.

Ein weiteres Anwendungsgebiet der CHO-Zellen ist die Erforschung des Zellzyklus. Dies wird insbesondere dadurch begünstigt, dass sich CHO-Zellen leicht im Zellzyklus synchronisieren lassen, so dass sich alle Zellen zur gleichen Zeit im gleichen Stadium befinden<sup>[134]</sup>.

Untersuchungen der DNA-Reparaturmechanismen werden durchgeführt, indem zum Beispiel gezielt das Verhalten von mutierten CHO-Zelllinie analysiert wird<sup>[135,136]</sup>. Diesen Varianten fehlt beispielsweise jeweils die Fähigkeit ein bestimmtes Protein zu synthetisieren. Wenn der Reparaturmechanismus nicht mehr richtig arbeitet, kann erkannt werden, dass das betreffende Protein an der Reparatur beteiligt ist.

Auf Grund ihrer kurzen Generationszeit und hohen Proteinexpressionsraten werden gentechnisch veränderte CHO-Zellen schon seit mehr als 20 Jahren in der

Pharmaindustrie in zunehmendem Maße dazu eingesetzt, wichtige Proteinwirkstoffe (sog. rekombinante Proteine) in großen Mengen herzustellen<sup>[12]</sup>. Da es sich um Säugerzellen handelt, weisen die erhaltenen rekombinanten Proteine hierbei meist mit dem humanen, natürlichen Äquivalent identische, für die Funktion essentielle, posttranslationale Modifikationen auf, so dass sie dem menschlichen Körper zugeführt werden können und in ihm wirken.

Die in dieser Arbeit verwendete CHO-Zelllinie wird als CHO-9 bezeichnet. Ihr Karyotyp weicht von nicht mutierten CHO-Zelllinien ab<sup>[137]</sup>. In CHO-9-Zellen befinden sich insgesamt nur 21 Chromosomen, von denen sich 13 gegenüber nichtmutierten CHO-Chromosomen durch Austauschen ganzer Abschnitte (innerhalb eines Chromosoms und/oder mit anderen Chromosomen) unterscheiden, wohingegen die Gesamtlänge der DNA konstant bleibt. Es gehen also keine Teile der DNA verloren und kommen keine neuen hinzu.

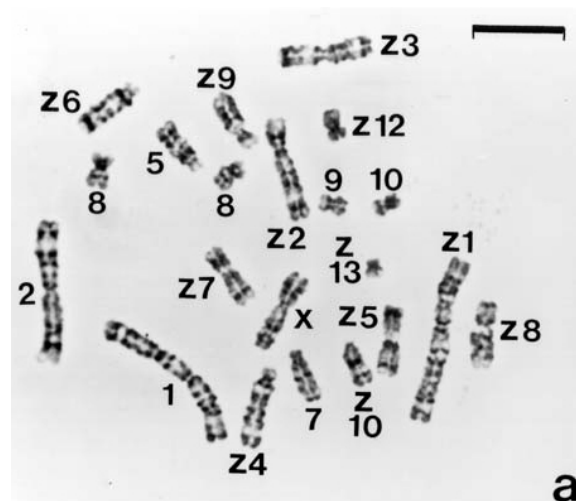


Abb. 28: Karyotyp der CHO9-Zelllinie mit nur 21 Chromosomen<sup>[137]</sup> (Balken 10 µm)

## 2.4.3 Platinbasierte Zytostatika und ihre Wirkungen

### 2.4.3.1 cis-Platin

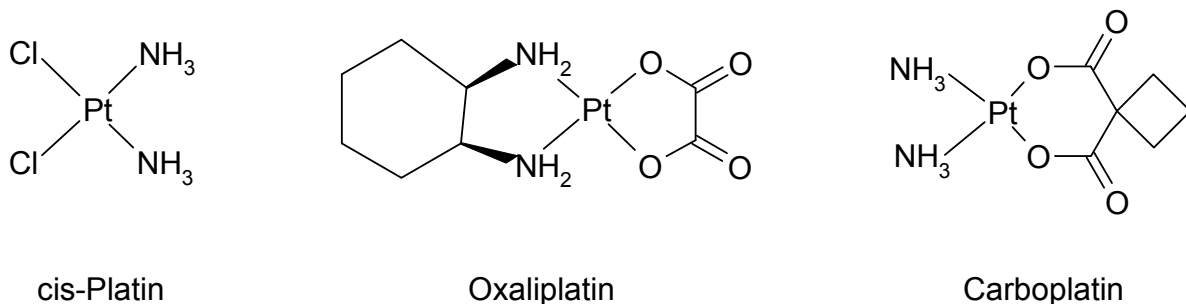
Die Entdeckung der Antitumoraktivität von cis-Platin (*cis*-Diammindichloroplatin(II)) erfolgte bereits 1969 durch Rosenberg et al.<sup>[138]</sup>. Sie stellt den ersten Schritt in der Erforschung der Klasse der platinbasierten Zytostatika dar. Heutzutage spielt cis-Platin in der Chemotherapie bei der Bekämpfung verschiedener Krebsarten wie zum Beispiel Gebärmutter- und Gebärmutterhalskrebs<sup>[139]</sup> eine zentrale Rolle. Für

Hodenkrebs können Heilungsraten von über 90 % erreicht werden, bei frühzeitiger Erkennung sogar fast 100%<sup>[140]</sup>.

Allerdings geht die Anwendung des Mittels mit starken Nebenwirkungen einher wie Nephrotoxizität (Nierenschädigung), Emetogenesis (Herbeiführung von Erbrechen) und akuter Neurotoxizität (Schädigung von Nervenzellen)<sup>[141]</sup>. Während die ersten beiden Effekte medikamentös und durch die verstärkte Gabe von Wasser in den Griff bekommen werden können<sup>[141]</sup>, bildet die Neurotoxizität eine Grenze in der Dosierung des Mittels, da das Absterben von Nervenzellen (Neuropathie), Tinnitus sowie der Verlust des Hochfrequenz-Gehörsinns die Folgen sein können<sup>[142]</sup>.

Zusätzlich zu den erwähnten Nebenwirkungen stellt sich bei bestimmten Krebsarten nach der Behandlung mit cis-Platin eine zunehmende Resistenz gegen das Mittel ein. In diesem Fall erscheint eine weitere Behandlung hierdurch nicht mehr angebracht, da eine Erhöhung der Dosis durch die Nebenwirkungen limitiert ist.

Um diese Nachteile zu umgehen und die Anzahl behandelbarer Tumorarten zu erhöhen, wurden bisher viele tausend cis-Platin-Analoga getestet. Es zeigten jedoch nur zwei Derivate eine Anti-Krebs-Aktivität: Carboplatin und Oxaliplatin<sup>[14]</sup>. Oxaliplatin kann zum Teil auch dort erfolgreich eingesetzt werden, wo sich schon eine Resistenz gegen cis-Platin ausgebildet hat.



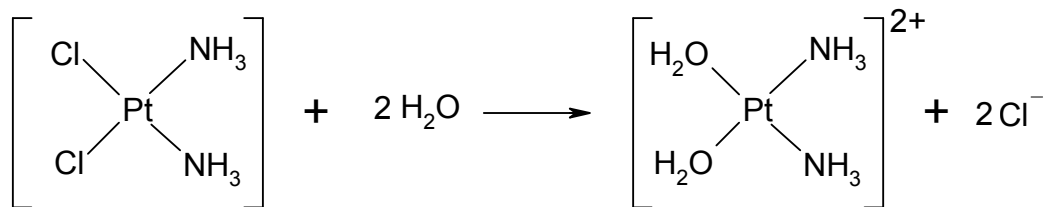
**Abb. 29: Platinbasierte Zytostatika: cis-Pt, Oxaliplatin und Carboplatin**

### 2.4.3.2 Wirkungen und Wirkmechanismus

Der genaue Mechanismus der Aufnahme von cis-Platin in die Zelle ist noch nicht vollständig erforscht. Während frühe Studien von einer Aufnahme basierend auf passiver Diffusion ausgehen<sup>[143-145]</sup>, konnten neuere Arbeiten Hinweise auf einen aktiven Aufnahmemechanismus über ein Kupfertransportprotein aufdecken<sup>[146,147]</sup>.

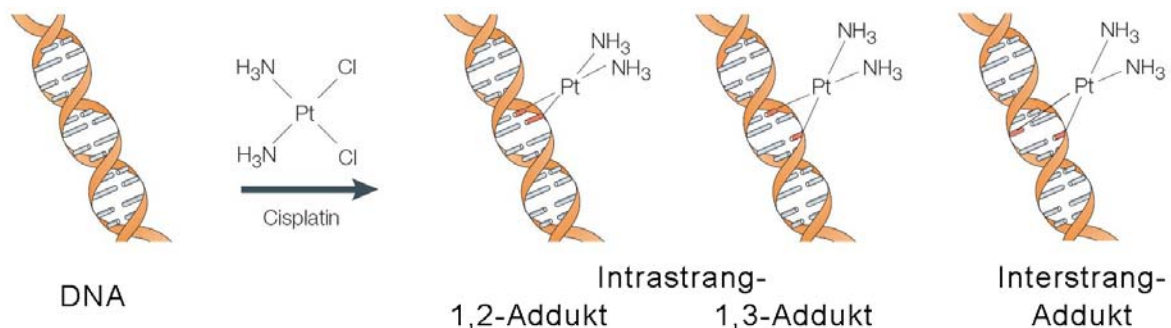


Die Stellen stimmen aber insofern überein, dass bei Zelleintritt eine Substitution der Chlorid-Liganden des cis-Platins durch Wassermoleküle stattfindet, welche auf Grund der geringeren Ligandenstärke des Chlorids und dessen geringerer Konzentration in der Zelle stattfindet (Abb. 30).



**Abb. 30:** Ligandenaustausch des cis-Platins beim Eintritt in die Zelle: Chlorid gegen Wasser

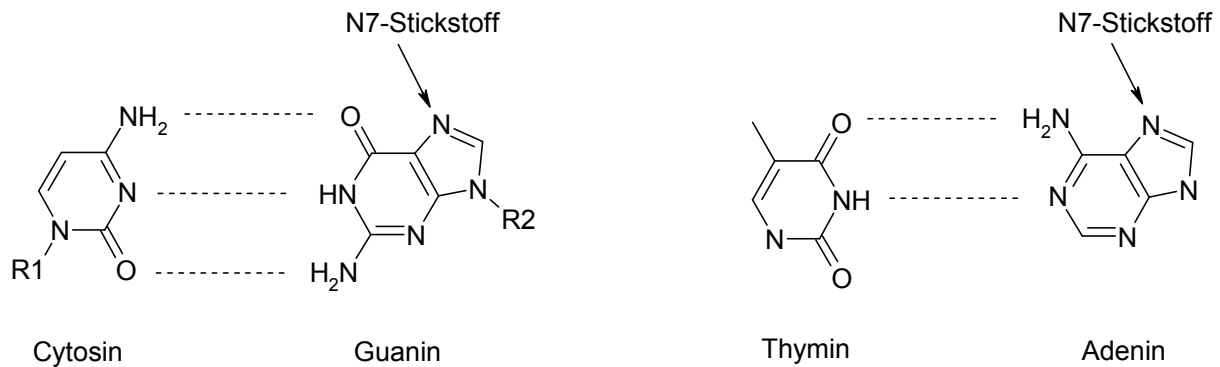
Die Wirkmechanismen aller cis-Platin-Derivate beruhen auf ihren Fähigkeiten innerhalb eines einzelnen DNA-Strangs 1,2- oder 1,3-Addukte zu bilden<sup>[14]</sup>. Ebenfalls treten zu einem kleinen Teil verbrückende Komplexe zwischen beiden Strängen der DNA-Doppelhelix auf<sup>[148]</sup>.



**Abb. 31:** Typen von cis-Pt-DNA-Komplexen<sup>[14]</sup>

1,2-Intrastrang-DNA-Addukte können zwischen zwei benachbarten Guanin-Basen sowie zwischen benachbartem Guanin und Adenin auftreten<sup>[139,149]</sup>. 1,3-Addukte sowie Interstrang-Addukte treten ausschließlich zwischen Guanin-Basen auf. Die dativen Bindungen zum Platin erfolgen jeweils über die N<sup>7</sup>-Stickstoff-Atome der Purinringe<sup>[150]</sup> (vgl. Abb. 32).





**Abb. 32: Mögliche Angriffspunkte von cis-Platin an der DNA: Die N7-Stickstoffe der DNA-Basen Guanin und Adenin**

Trotz einer Vielzahl von Interaktionsmöglichkeiten für cis-Platin-Derivate in einer Zelle konnte gezeigt werden, dass die DNA und damit die Bildung von DNA-Addukten das primäre Ziel des Wirkstoffes ist<sup>[139]</sup>. Zurückzuführen ist dies auf den Chelateffekt und die damit verbundene erhöhte Stabilität des Pt-DNA-Komplexes.

Ein solcher Komplex führt bei der nächsten Teilung einer Zelle zu einem Fehler im Duplikationsprozess der DNA und hat entweder einen sog. Zellzyklusarrest (Stopp des Zellzyklus) mit anschließendem Reparaturversuch zur Folge oder direkt die Induktion des programmierten Zelltods (Apoptose)<sup>[14]</sup>. Beide Wirkungen sind bei der Krebstherapie erwünscht, da sie zu einer Rückbildung des Tumors führen können.

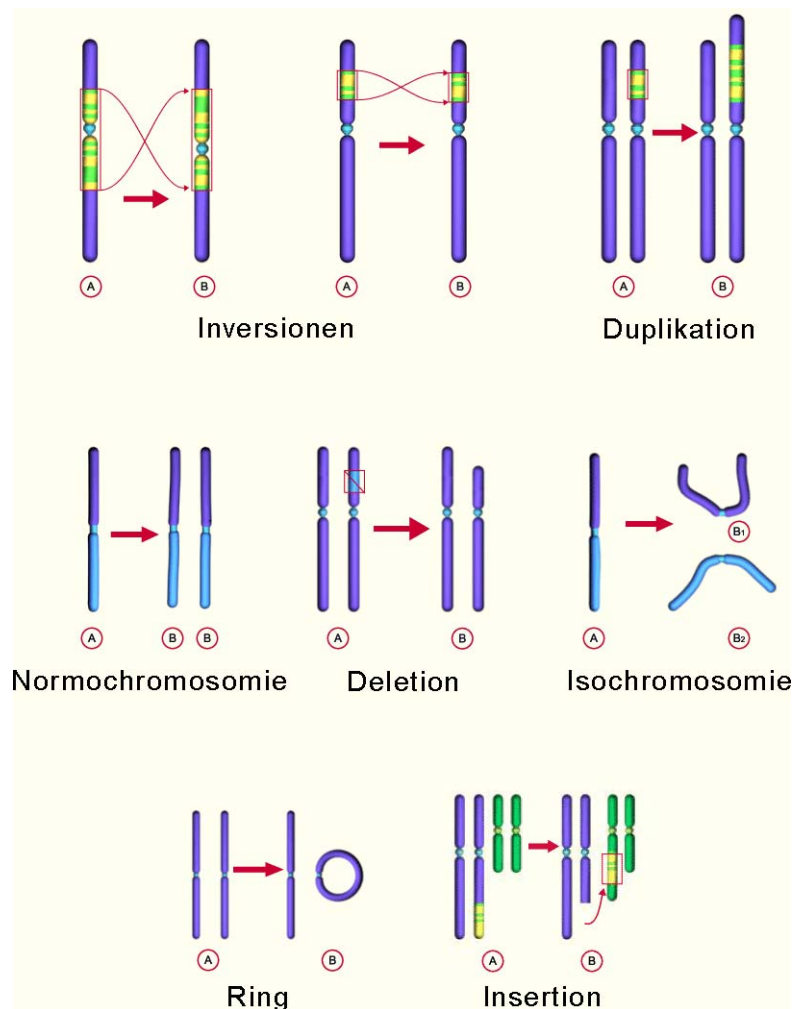
### 2.4.3.3 DNA-Reparatur und Bildung von Chromosomenaberrationen

Bei dem Versuch der zellinternen Reparaturmechanismen das cis-Platin-DNA-Addukt zu entfernen, wird der DNA-Doppelstrang in seine beiden Einzelstränge aufgespalten und die fehlerhafte Stelle großzügig auf einer Länge von ca. 30 Basenpaaren ausgeschnitten. Die nun fehlenden Basenpaare werden im nächsten Schritt, ähnlich dem Verdopplungsmechanismus der DNA, anhand der Basenreihenfolge des verbleibenden Stranges durch dessen Bindungspartner ergänzt (Adenin (A) durch Thymin (T), Cytosin (C) durch Guanin (G) und jeweils umgekehrt).

Ein Problem bei dieser Reparatur stellen die sog. Inter-Strang-Addukte dar. Bei dem Versuch den Schaden zu beheben, kommt es vor, dass beide DNA-Stränge gleichzeitig durchtrennt werden. In einem solchen Fall ist es der Zelle nicht mehr möglich, die Sequenz fehlerfrei zu vervollständigen und es kommt zu Mutationen, bei

denen Teile der DNA-Sequenz beispielsweise verloren gehen oder falsch herum eingebaut werden können. Sichtbar werden solche Mutationen in der Metaphase des Zellzyklus, da hier die DNA in Form von Chromosomen vorliegt, die lichtmikroskopisch ausgewertet werden können. Diese sog. Chromosomenaberrationen können wie in Abb. 33 gezeigt in verschiedene Klassen unterteilt werden, je nachdem was für eine Mutation vorliegt und wo diese aufgetreten ist.

Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass cis-Platin sowohl zytostatisch als auch mutagen wirkt, wobei die zytostatische Wirkung die der mutagenen überwiegt.



**Abb. 33:** Verschiedene Typen von Chromosomenaberrationen

### 3 Methodischer Teil

#### 3.1 Geräte

**Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Typbezeichnung, Firma und Sitz der Firma</b>
Reinstwasseranlage	ELGA PURELAB ultra genetic (ELGA LabWater, Celle)
Analysenwaage	CP 324 S (Sartorius AG, Göttingen)
Ultraschallgerät	Model W220F (Heat Systems - Ultrasonnics, New York, USA)
Laser-Ablationssystem	UP-213 FB (New Wave Research, Inc., Fremont, CA, USA)
Ablations-Kryozelle	Cryocell (New Wave Research, Inc., Fremont, CA, USA)
ICP-MS	Octopole-CRC-ICP-MS 7500 cs (Agilent Technologies, Yokogawa, Japan)
Zweistufige Subboiling-Apparatur	MQSB-Quarz-Subboiling (Maassen GmbH, Eningen)
Mikrowellen-druckaufschlussgerät	Mars 5 (CEM, Kamp-Lintfort)
Kryomühle	Freezer Mill 6850 (Spex CertiPrep, Metuchen, USA)
Planetenkugelmühle	MP 4 (Retsch GmbH, Laan)
Gefriertrocknungsanlage	ALPHA 1-4 (Christ, Osterode am Harz)
Laminar-Flow-Box	Laminar-Flow Box FBS (Spectec, Erding)
Sterilbank	Biowizard (KOJAIR Tech Oy, Vilppula, Finland)
Kryostat	UK 12/600 (Behr Labor-Technik GmbH, Düsseldorf)
Ultratiefkühlschrank	Hera freeze, HFU 686 Basic (Heraeus Holding GmbH, Hanau)
Zentrifuge	Sigma 4-10 (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz)
Trockenschrank	ULE 500 (Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach)

---

Elementaranalysator CHNS	Euro EA 3000 (Euro Vector, Mailand, Italien)
Muffelofen	VMK 80 (Linn High Term GmbH, Hirschbach-Eschenfeld)
Kryomikrotom	Microm HM 560 Microm International, Walldorf
pH-/Redoxwert Messgerät	WTW pH 197 (WTW, Weilheim)

### 3.2 Chemikalien

**Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien**

<b>Chemikalie</b>	<b>Firma, Sitz der Firma</b>
Acrylamid >99% p.a.	Roth, Karlsruhe
N,N'-Methylen-bis-acrylamid (BIS)	Roth, Karlsruhe
Rothiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat p.a. (APS)	Roth, Karlsruhe
Tetramethylethylendiamin (TMEDA) p.a.	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) Pufferan Ultra Qualität p.a. >99,9 %	Roth, Karlsruhe
PVDF-Blotmembran Immobilon pSQ	Millipore GmbH, Schwalbach
PVDF-Blotmembran Hybond P	Amersham Bioscience, GE Healthcare Europe GmbH, München
Doppelseitiges Klebeband	Tesa, Beiersdorf, Hamburg
Argon 4.6	Air Liquide, Düsseldorf
Helium 5.0	Air Liquide, Düsseldorf
Kryogewebekleber zum Aufkleben von Gewebeproben auf Probenteller des Kryomikrotoms	Tissue-Tek O.C.T. Compound, Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande
McCoy's Medium <sup>[151]</sup> (Zellkulturmedium)	c c pro GmbH, Oberdorla
Pepsin	c c pro GmbH, Oberdorla
RNAse A	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen
GIEMSA – Lösung (Azur-Eosin-Methylenblaulösung)	Merck KGaA, Darmstadt
PBS-Lösung (pH= 7,4): 8,0 g/L NaCl 0,2 g/L KCl 1,44 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,24 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Invitrogen Ltd, Paisley, UK
Objektträger	Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshafen

### 3.3 *Elementstandardlösungen*

**Tabelle 4: Verwendete Elementstandardlösungen**

<b>Element in Lösungsmittel</b>	<b>Konzentration und Genauigkeit</b>	<b>Firma / Sitz der Firma</b>
Cr in 5% HCl	1,013 ± 0,005 g/L	Merck KGaA, Darmstadt
Cu in 2% HNO <sub>3</sub>	1,000 ± 0,003 g/L	Acros Organics, New Jersey, USA
Fe in 2-3% HNO <sub>3</sub>	1,000 ± 0,005 g/L	Merck KGaA, Darmstadt
Ga in 2% HNO <sub>3</sub>	1,000 ± 0,005 g/L	Acros Organics, New Jersey, USA
In in 2% HNO <sub>3</sub>	1,000 ± 0,005 g/L	Acros Organics, New Jersey, USA
K in 0,5 M HNO <sub>3</sub>	1,000 g/L	Bernd Kraft GmbH, Duisburg
Mg in 0,5 M HCl	1,000 ± 0,002 g/L	Merck KGaA, Darmstadt
Mn in 0,5 M HNO <sub>3</sub>	1,000 g/L	Bernd Kraft GmbH, Duisburg
Ni in 2% HNO <sub>3</sub>	1,000 ± 0,005 g/L	Acros Organics, New Jersey, USA
Sc in 2% HNO <sub>3</sub>	1,000 ± 0,003 g/L	Acros Organics, New Jersey, USA
Sn in 7% HCl	996 ± 0,005 g/L	Merck KGaA, Darmstadt
Tl in 5% HNO <sub>3</sub>	1,000 g/L	Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe
Y in 2-3% HNO <sub>3</sub>	1,003 ± 0,003 g/L	Merck KGaA, Darmstadt
Zn in 2% HCl	1,000 ± 0,003 g/L	Acros Organics, New Jersey, USA

### 3.4 *Zertifizierte Standardreferenzmaterialien*

**Tabelle 5: Verwendete zertifizierte Standardreferenzmaterialien**

<b>Name</b>	<b>Hersteller, Sitz</b>
NIST 610 <sup>[110]</sup> Trace Elements in a Glass Matrix (3 mm Wafer) Nominal Trace Element Concentration 500 mg/mg (ppm)	National Institute for Standards & Technology (NIST), Gaithersburg, USA
NIST 612 <sup>[111]</sup> Trace Elements in a Glass Matrix (3 mm Wafer) Nominal Trace Element Concentration 50 mg/mg (ppm)	National Institute for Standards & Technology (NIST), Gaithersburg, USA
SRM 2976 <sup>[152]</sup> (Mussel Tissue – Trace Elements and Methylmercury)	National Institute for Standards & Technology (NIST), Gaithersburg, USA

## 3.5 Methoden

### 3.5.1 Tuning der ICP-MS im trockenen Plasma für die LA-ICP-MS

Zum Einstellen der optimalen Sensitivität und möglichst geringer isobarer molekularer Interferenzraten der ICP-MS im trockenem Plasma für die LA-ICP-MS-Kopplung ist eine neue Tuningmethode entwickelt worden. Anstelle der im feuchten Plasmabetrieb gebräuchlichen 1 µg/L Multielementstandardlösung (Li, Co, Y, Ce, Ti) tritt hier der 3mm dicke Glaswafer des Standardreferenzmaterials NIST 612 „Trace Elements in a Glass Matrix“. Die nominale Spurenelementkonzentration für insgesamt 61 Elemente beträgt 50 mg/kg<sup>[111]</sup>. Durch die Verwendung des Glaswafers ist es allerdings nicht mehr zweckmäßig zur Einstellung der optimalen Sensitivität über den gesamten Massenbereich die im feuchten Plasmabetrieb üblichen Tunemassen von  $m/z$  7 (Li),  $m/z$  89 (Y) und  $m/z$  205 (Ti) zu verwenden. Die Elemente Lithium, Yttrium und Thallium sind zwar im Wafer enthalten, jedoch ist von Lithium und Yttrium nicht bekannt in welcher Konzentration sie vorliegen, noch wie homogen sie verteilt sind. Auch der Konzentrationswert für Thallium ist nicht zertifiziert.

Im trockenen Plasma haben sich als gute Alternative deshalb die  $m/z$ -Verhältnisse entsprechend der Isotope  $^{11}\text{B}$ ,  $^{88}\text{Sr}$  sowie  $^{238}\text{U}$  herausgestellt, da die Konzentrationen dieser Elemente im Wafer bekannt und mit Ausnahme des Bors auch zertifiziert sind. Das Bor wird dennoch zum Tuning verwendet, da das leichteste Element, dessen Konzentration zertifiziert ist, mit Eisen schon im mittleren Massenbereich des PSE liegt.

Die Oxidbildungsrate wird über das Verhältnis von  $m/z$  248 /  $m/z$  232 (ThO/Th) ermittelt, wie es sich in der Literatur zur LA-ICP-MS allgemein durchgesetzt hat, da Thoriumoxid den höchsten Schmelzpunkt aller Metalloxide besitzt<sup>[153]</sup>. Das Verhältnis  $m/z$  156 /  $m/z$  140 ( $\text{CeO}^+/\text{Ce}^+$ ) kann nicht benutzt werden, da NIST 612 Gadolinium (Gd) enthält, das einen Isotopenanteil von 20,47 % an  $^{156}\text{Gd}$  enthält.

Die Bildungsrate der doppeltgeladenen Ionen wird weiterhin anhand des Verhältnisses  $m/z$  70 /  $m/z$  140 ( $\text{Ce}^{2+}/\text{Ce}^+$ ) bestimmt.

Um die Werte vergleichbar zu halten, werden für die Laser-Ablation folgende Parameter als sogenannte Standard-Tuningparameter festgesetzt.

**Tabelle 6: Standard-Tuningparameter der LA-ICP-MS**

Parameter	Größe
Spotgröße	100 µm
Schussfrequenz	10 Hz
Geschwindigkeit	20 µm/s
Energiedichteregler	75%
Aufwärmphase	>60 min
Ablationsgasstrom	He 1,4 L/min (100%)

Mit diesen Parametern ist beim Tuning mittels eines LA-Linienscans eine relative Standardabweichung von 3-6% auf allen Massen zu erreichen. Die Oxidbildungsrate und die Bildungsrate doppeltgeladener Ionen werden auf unter 1 bzw. 2 % eingestellt.

Zur Einstellung der P/A-Faktoren nach dem Tune bietet sich als optimale Lösung die Verwendung des Standardreferenzmaterials NIST 610 „Trace Elements in a Glass Matrix“<sup>[110]</sup> mit einer nominalen Spurenelementkonzentration von 500 mg/kg für 61 Elemente an. Auch hier werden die oben genannten Standard-Tuningparameter für die Laser-Ablation verwendet und ein Linienscan über die NIST-Glasoberfläche programmiert. Um die Einstellung der P/A-Faktoren über den gesamten Massenbereich zu erhalten, ist in NIST 610 nach geeigneten Elementen gesucht worden und folgende Tuningmassen sind ermittelt worden (Tabelle 7). Diese sind in einer eigenen Methode „LA\_PA.M“ abgespeichert worden, um im Bedarfsfall schnell geladen werden zu können.



**Tabelle 7: Verwendete Isotope im SRM NIST 610 zur Bestimmung der P/A-Faktoren unter Standardtuneparametern**

Element	m/z	Element	m/z
Li	7	Sr	88
Ne	20	In	115
Mg	24	Pr	141
S	32	Tm	169
K	39	Ta	181
Sr	45	Bi	209
Mn	55	U	238
Ga	69		

### **3.5.2 Bestimmung des Auswaschverhaltens des Feststoffaerosols aus einer Ablationskammer**

Zur Bestimmung des Auswaschverhaltens des durch Laser-Ablation erzeugten Feststoffaerosols aus der Ablationskammer wird ein mit einer PVDF-Membran bespannter Objektträger (50 mm x 25 mm) in die Ablationskammer eingeführt. Die Kamera des Laser-Ablationssystems wird auf die Oberfläche fokussiert und ein Gitter aus Einzelschussanalysen über den kompletten Objektträger gelegt. Der Abstand zwischen den Schusspositionen beträgt jeweils einen Millimeter in horizontaler sowie in vertikaler Richtung. Zur Aufnahme des Auswaschverhaltens werden folgende Ablationsparameter verwendet:

**Tabelle 8: Ablationsparameter zur Untersuchung des Auswaschverhaltens der Ablationskammer**

Parameter	Größe
Wellenlänge	213 nm
Pulsdauer	3-5 ns
Energiedichte	2 J/cm <sup>2</sup>
Spotdurchmesser	100 µm
Schussfrequenz	1 Hz
Öffnungszeit	1 s
Aufwärmzeit	10 s
Auswaschverzögerung	30 s
Ablationsgasstrom (He)	1,4 L/min
Trärgas (Ar)	1,09 L/min

Das ICP-MS wird zuvor auf maximale Sensitivität und geringe Oxidbildungsrate getunt. Der p/A-Faktor wird neu eingestellt. Die grundlegenden Parameter lauten wie folgt:

**Tabelle 9: ICP-MS-Parameter zur Untersuchung des Auswaschverhaltens der Ablationskammer**

ICP-MS Parameter	Größe
RF Power	1550 W
Plasmagasstrom	15 L/min
Elemente	<sup>13</sup> C, <sup>80</sup> Se, <sup>121</sup> Sb
Integrationszeit	0,01 s
Sampling period	0,034 s

### 3.5.3 Temperaturmessung in der Kryozelle

Um die Kryozelle zu charakterisieren, ist es notwendig die Proben­temperatur in Abhängigkeit zur eingestellten Temperatur zu messen. Hierzu wird die Temperatur an drei verschiedenen Stellen in der Kryozelle gemessen. Zum einen verwendet man das ins Peltierelement integrierte Thermometer zur Bestimmung der sog. Kerntemperatur. Zur Bestimmung der Proben­temperatur auf der Probenoberfläche wird die Temperatur mittels eines mit der Oberfläche in Kontakt stehenden Thermoelements gemessen. Als letzte charakteristische Temperatur wird die Gastemperatur am Zellausgang aufgenommen. Zur bestmöglichen Simulation der

Analysenbedingungen werden die Messungen bei geschlossener Ablationskammerschublade durchgeführt, wobei die Temperatursonde jeweils durch die Öffnung des Gasauslasses bei laufendem Trägergasstrom eingeführt wird. Als Probe wird hierbei ein üblicher Glasobjektträger (1 x 5 x 25 mm<sup>3</sup>) verwendet.

**Tabelle 10: Arbeitsparameter der Kryozelle**

Trägergasstrom (He)	1,4 L/min
Vorlauftemperatur des Kryostaten	5 °C
Stabilisierungszeit	10 min
Aufheizrate	10 °C / min
Tiefste stabil zu erreichende Temperatur	- 31,4 °C
Untersuchter Temperaturbereich	-30 °C bis 20 °C

Zur Bestimmung der Temperaturen (Kern, Oberfläche, Ausgang) wird über die Temperatursteuerung die Solltemperatur im Bereich von -30 °C bis +20°C jeweils in Schritten von 5 °C eingestellt und die Messungen nach einer Stabilisierungszeit von jeweils 10 min durchgeführt.

Zur Messung des Effekts der Zellbeleuchtung auf die Oberflächentemperatur, werden bei einer voreingestellten Temperatur von -30 °C jeweils bei vollen Beleuchtungsintensitäten der einzelnen Beleuchtungsmodi (Ring, Durchlicht und Punkt) die Oberflächentemperaturen gemessen und als Bezugsgröße mit der Temperatur bei deaktivierter Beleuchtung verglichen.

### **3.5.4 Wassergehalts- und Glühverlustbestimmung**

Die Bestimmungen des Wassergehalts sowie des Glühverlustes von Gewebeproben werden jeweils als Vierfachbestimmung im Trockenschrank (ULE 500, Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach) bzw. im Muffelofen (VMK 80, Linn High Term GmbH, Hirschbach-Eschenfeld) den Normen EN 12880 bzw. EN 12879 entsprechend durchgeführt.

Zusätzlich wird der Wassergehalt durch Gefriertrocknung überprüft. Hierzu werden ca. 50 g fein pürierte und kryogemahlene Gewebematrix (Schweineleber bzw. Rattenhirn, usw.) in eine große tarierte Petrischale ohne Deckel eingewogen und die Probe mittels eines auf -195 °C gekühlten Aluminiumblocks innerhalb von 2 Minuten gefroren. Die gefrorene Probe wird in die Gefriertrocknungsanlage (ALPHA 1-4;

Christ, Osterode am Harz) gegeben und diese umgehend gestartet. Die eigentliche Gefriertrocknung findet über einen Zeitraum von 24 h im Vakuum bis zu einem Enddruck von 0,06 mbar statt. Nach dem Aufheben des Vakuums wird umgehend die getrocknete Probe ausgewogen und aus der Gewichts Differenz der Wassergehalt bestimmt.

### **3.5.5 Bestimmung der CHNS- und O-Gehalte**

Die Bestimmung der Gehalte an Kohlenstoff (C), Wasserstoff (H), Stickstoff (N), Schwefel (S) und Sauerstoff (O) per Elementaranalysator (Euro EA 3000, Euro Vector, Mailand, Italien) erfolgt in Zusammenarbeit mit Frau K. Brauner und Frau V. Hiltenkamp vom Labor für Mikroanalytik und Thermoanalyse des Instituts für Anorganische Chemie der Universität Duisburg-Essen.

### **3.5.6 Gesamtmetallbestimmung**

Zur Bestimmung der Gesamtmetallgehalte werden die Probensubstanzen im Mikrowellengerät (Mars 5, CEM, Kamp-Lintfort) mittels eines oxidativen Mikrowellendruckaufschlusses in geschlossenen Teflongefäßen aufgeschlossen. Der Aufschluss erfolgt unter automatischer Druck- und Temperaturkontrolle entsprechend der programmierten Parameter.

Vor dem Aufschluss der Proben werden die zu verwendenden Gefäße durch zwei aufeinander folgende Reinigungsaufschlüsse mit jeweils 10 mL subgeboilter Salpetersäure (65%) von Kontaminationen befreit. Als Temperaturprogramm hierfür dient eine lineare Aufheizphase von 15 min auf 200 °C mit anschließendem Halten der Temperatur für 20 min.

Die Einwaage pro Gefäß liegt einheitlich bei ca. 1 g und wird für jede Probensubstanz dreimal repliziert. Nach Zugabe von 10 ml subgeboilter Salpetersäure (65%) erfolgt ein druckloser Voraufschluss von 10 min bei Raumtemperatur, bevor die Mikrowelle mit den Aufschlussgefäßen bestückt wird.

Das Aufschlussprogramm sieht wie folgt aus:

1. Lineare Aufheizphase über 10 min auf 80 °C
2. Halten der Temperatur für 5 min
3. Lineare Aufheizphase über 10 min auf 130 °C
4. Halten der Temperatur für 5 min
5. Lineare Aufheizphase über 10 min auf 190 °C
6. Halten der Temperatur für 20 min

Nach dem Abkühlen der Gefäße auf Temperaturen von unter 50 °C findet eine Überführung der Aufschlusslösungen unter mehrmaligem Nachspülen mit Reinstwasser in tarierte 50 mL Probengefäße statt, die jeweils auf ca. 50 mL mit Reinstwasser aufgefüllt werden. Die Lösungen werden ausgewogen und anschließend mittels ICP-MS (Octopole-CRC-ICP-MS 7500 cs, Agilent Technologies, Yokogawa, Japan) analysiert. Die Konzentrationen werden durch eine externe Kalibration über einen je nach Element und dessen Vorkommen variierenden Konzentrationsbereich (siehe Tabelle 11) ermittelt. Die Kalibrationsgeraden werden doppellogarithmisch erstellt, um eine hohe Genauigkeit über mehrere Größenordnungen hinweg zu erhalten, wobei der lineare Bereich für jedes Element einzeln bestimmt wird.

**Tabelle 11: Kalibrierte Isotope und Kalibrationsbereich der mittels Aufschluss bestimmten Elemente**

<b>Element</b>	<b>m/z</b>	<b>Kalibrationsbereich</b>
Magnesium (Mg)	24	200 µg/ml bis 20 ng/ml
Calcium (Ca)	43	100 µg/ml bis 10 ng/ml
Mangan (Mn)	55	100 µg/ml bis 10 ng/ml
Eisen (Fe)	56, 57	200 µg/ml bis 20 ng/ml
Cobalt (Co)	59	10 ng/g bis 1 pg/g
Nickel (Ni)	60	10 ng/g bis 1 pg/g
Kupfer (Cu)	63	100 µg/ml bis 10 ng/ml
Zink (Zn)	66	100 µg/ml bis 10 ng/ml
Zinn (Sn)	116,118,120	10 ng/g bis 1 pg/g

### 3.5.7 Herstellung der Kalibrationsproben für die Standardaddition zur Quantifizierung von Elementkonzentrationen in der Modellmatrix Schweineleber

Vor dem eigentlichen Ansatz der Kalibrationsproben wird eine Multielementstammlösung angesetzt, die etwa die 20-fachen Elementkonzentrationen von gewöhnlicher Schweineleber aufweist, wie sie aus der Literatur bekannt sind<sup>[154-156]</sup>.

Da diese Konzentrationen sehr hoch sind (Tabelle 12), können sie zum Teil nicht mehr aus den zur Verfügung stehenden Standardlösungen mit nur 1 g/L Elementkonzentration angesetzt werden. Der Ansatz erfolgt also durch direkte Einwaage entsprechender Mengen an Ursubstanzen. Für einen Ansatz von 100 mL Multielementstammlösung in einem Messkolben werden die folgenden Einwaagen benötigt:

**Tabelle 12: Ansatz der Multielementstammlösung für die Standardaddition**

Element	Molare Masse des Elements in g/mol	Zielkonzentration in µg/mL	Ursubstanz	Molare Masse der Ursubstanz in g/mol	Einwaage der Ursubstanz in g	Volumen Standardlösung in µL
Fe	55,845	13000	Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	404,0	9,4046	
Mn	54,938	200	MnCO <sub>3</sub>	114,95	0,0418	
Co		0,4	Co Standardlösung 1,000 g/L			40
Cu	63,546	1400	CuO	79,545	0,1752	
Zn	65,39	5000	Zn	65,39	0,5000	
Mg	24,305	20000	MgCO <sub>3</sub>	84,313	6,9379	
Ca	40,078	5000	CaCO <sub>3</sub>	100,09	1,2487	
Ni		0,2	Ni Standardlösung 1,000 g/L			20
Sn		2	Sn Standardlösung 1,000 g/Ld			200

Zunächst werden das Zink und das Kupfer(II)oxid in 3 mL konzentrierter subgeboilter Salpetersäure aufgelöst. Die Lösung wird anschließend vorsichtig quantitativ unter mehrmaligem Nachspülen mit destilliertem Wasser in den 100 mL Messkolben überführt, in dem bereits die restlichen Feststoffe eingewogen und mit ca. 30 ml destilliertem Wasser versetzt wurden. Im nächsten Schritt werden die entsprechenden Volumina der Standardlösungen (Co, Ni, Sn) und weitere 3 ml konzentrierter Salpetersäure in kleinen Schritten hinzupipettiert. Nachdem die

Carbonate ausgetrieben sind und eine klare Lösung erhalten wird, füllt man bis auf 100 mL mit destilliertem Wasser auf und schüttelt.

Von der Stammlösung (ca. 20-fach) ausgehend wird anschließend eine Verdünnungsreihe angesetzt in Schritten die den folgenden relativen Konzentrationen 10-fach, 5-fach, 2-fach, 1-fach und 0,5-fach entspricht.

Um die Standardadditionsproben anzusetzen wird zu 1 g gefriergetrocknetem und mit der Planetenkugelmühle fein gemahlenem Schweinelebergewebepulver das entfernte Volumen an Wasser durch die dichtekorrigierte Zuwaage der jeweiligen Standardlösung ersetzt. Nach sorgfältiger Homogenisierung mittels Rührens und Ultraschallbad werden die zuvor gründlich gereinigten Cryomolds mit dem Gewebepulver bestückt und auf einem auf -195°C gekühlten Aluminiumblock (Abb. 34, S. 72) schockgefroren.

### 3.5.8 Herstellung synthetischer, matrixangepasster Kalibrationsproben basierend auf Polyacrylamid

Nach der Ermittlung der zu erzielenden Acrylamidkonzentration durch den Abgleich der CHNO-Verhältnisse werden in je einem 15 mL Probenröhrchen die Polymerisationslösungen der matrixnachahmenden Polyacrylamid-Gele angesetzt. Hierzu wird zur Nachahmung der jeweiligen Matrix (Tabelle 13) die benötigte Masse an Acrylamid/BIS-Mischung und 1,3 g TRIS zu 10 mL der entsprechenden Multielementstandardlösung eingewogen und bis zum vollständigen Lösen der Feststoffe langsam geschüttelt.

**Tabelle 13: Einwaagen an Acrylamid/BIS-Mischung zur Nachahmung verschiedener Analysenmatrizes und die resultierende Polyacrylamidkonzentration im Gel**

Nachzuahmende Matrix	Einwaage der Acrylamid/BIS Mischung	Resultierende Massenkonzentration an Polyacrylamid
Schweineleber	2,86 g	20,2 %
Rattencortex	1,70 g	13,1 %
Säugergewebe allgemein <sup>[1]</sup>	1,21 g	9,2 %

Als Multielementstandardlösung werden Verdünnungen der bereits bei der Standardaddition verwendeten Multielementstammlösung verwendet (Siehe Tabelle 14).

**Tabelle 14: Zusammensetzung der Multielementstandardlösungen zum Ansatz der synthetischen Kalibrationsgele**

<b>Isotop</b>	<b>Verdünnung 1:19 Elementkonzentration in µg/g</b>	<b>Verdünnung 1:39 Elementkonzentration in µg/g</b>	<b>Verdünnung 1:79 Elementkonzentration in µg/g</b>
<sup>24</sup> Mg	855,979	427,990	213,995
<sup>43</sup> Ca	216,286	108,143	54,071
<sup>44</sup> Ca	210,730	105,365	52,683
<sup>54</sup> Fe	533,531	266,766	133,383
<sup>55</sup> Mn	9,002	4,501	2,251
<sup>56</sup> Fe	580,131	290,065	145,033
<sup>57</sup> Fe	584,342	292,171	146,086
<sup>59</sup> Co	0,030	0,015	0,008
<sup>60</sup> Ni	0,257	0,129	0,064
<sup>63</sup> Cu	70,019	35,010	17,505
<sup>65</sup> Cu	71,572	35,786	17,893
<sup>66</sup> Zn	390,784	195,392	97,696
<sup>68</sup> Zn	395,681	197,840	98,920
<sup>116</sup> Sn	0,206	0,103	0,051
<sup>118</sup> Sn	0,300	0,150	0,075
<sup>120</sup> Sn	0,210	0,105	0,052

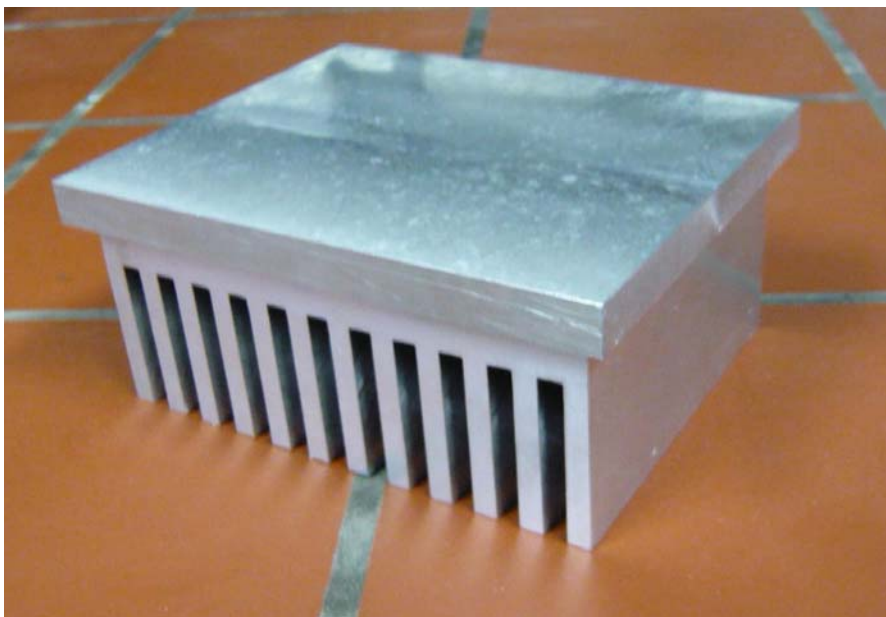
Die Lösung hat nun auf Grund des TRIS einen pH-Wert von 8. Zum Starten der Polymerisation werden 100 µL 10% APS-Lösung und 8 µL TMEDA als Katalysator hinzugesetzt und die Reaktionslösung schnell durch Schütteln homogenisiert. Jeweils 600 µL der Lösung werden in gereinigte Cryomolds pipettiert und anschließend mit einem Deckel abgedeckt. Nach ca. 15 min ist das Reaktionsgemisch zu einem Gel erstarrt. Um die Polymerisation zu vervollständigen, wird noch einmal 30 min gewartet. Anschließend werden die in den Cryomolds befindlichen Kalibrationsgele auf einen mit dem Fuß in flüssigem Stickstoff stehenden Aluminiumblock (-195 °C; Abb. 34) gestellt. Die Gele werden auf diese Weise schockgefroren. Die gefrorenen Gele können nun bis zur weiteren



Verwendung gelagert werden oder direkt dem Kryomikrotom zur Herstellung dünner Schnitte zugeführt werden.

### 3.5.9 Anfertigung von Gewebe- und Kalibrationsgelschnitten

Die zu untersuchenden Gewebe oder Gewebeäquivalente werden in kleine 10 mm x 10 mm x 5 mm große Förmchen (sog. Cryomolds) gegeben und auf die glatte Oberfläche eines aus flüssigem Stickstoff ragenden, selbstentwickelten Aluminiumblocks mit Kühlrippen gestellt. Da auf diese Weise die beim Abkühlen in flüssigem Stickstoff auftretende isolierende Gasschicht vermieden wird, kann ein schockartiges Gefrieren der Probe erreicht werden, bei dem zudem keine Kontaminationsgefahr durch Verunreinigungen im Stickstoff besteht.



**Abb. 34: Selbstentwickelter Alublock mit Kühlrippen zum Schockfrieren von Gewebeproben in Cryomolds**

Die schockgefrorenen Proben werden aus den Cryomolds gelöst und mittels eines speziellen Kryogewebeklebers (Tissue-Tek O.C.T. Compound, Sakura Finetek) auf die Probenteller des Kryomikrotoms (Microm HM 560, Microm International, Walldorf) aufgeklebt und ins Kryomikrotom eingespannt. Die Probenschnitte werden hergestellt, indem zunächst die Oberflächenschicht abgehobelt und verworfen wird, bis ein Schnitt über die ganze Fläche der Probe erhalten werden kann. Per

Handantrieb werden nun drei Parallelschnitte in Scheiben von 10 µm angefertigt und auf in 5% Salpetersäure und 10 Minuten Ultraschallbad gereinigten Objektträgern aufgetragen. Beim Schneiden muss darauf geachtet werden, dass die Temperatur der Klinge und des Probentisches derart gewählt werden, dass die Probe weder spröde wird, noch zu weich erscheint, um ein ideales Ergebnis zu erreichen. Als gute Parameter haben sich bewährt:

**Tabelle 15: Parameter des Kryomikrotoms zum Gewebe- und Gelschnitt**

Klinge	Kohlenstoffstahl
Klingentemperatur	-24 °C
Probentischtemperatur	-30 °C
Umgebungstemperatur	-20 °C

### **3.5.10 Methode zur Gewebeuntersuchung mittels LA-ICP-MS**

Um eine zweidimensionale Aufnahme der Elementverteilung in einem Gewebeschnitt zu erhalten, wird zunächst die Probe in die auf -25 °C vortemperierte Kryoablationskammer gegeben und diese 20 min lang mit Helium gespült. Auf diese Weise wird der Sauerstoff möglichst vollständig aus der Ablationskammer entfernt. Dies ist insbesondere wichtig bei Messungen des Elements Phosphor (P) auf m/z 31, da hier ansonsten der Hintergrund bei kürzerem Spülen durch die molekulare, isobare Interferenz  $\text{NO}^+$  deutlich erhöht wäre. Während des Spülens wird die Kamera auf die Probenoberfläche fokussiert und zur Orientierung auf der Probe eine Probenkarte des zu untersuchenden Gewebeschnitts aufgenommen. Anschließend wird ein Ablationsmuster aus parallelen gleichlangen Linienscans programmiert, die sich gegenseitig schwach überlagern, so dass die gesamte Fläche des Gewebeschnittes im Untersuchungsgebiet analysiert werden kann. Die Ablationsparameter werden so gewählt, dass eine vollständige Ablation des Gewebes mit möglichst geringer Energiedichte erreicht wird. Vor jedem Linienscan finden eine Auswaschverzögerung von 20 s und eine Aufwärmzeit von 15 s statt. Um eine möglichst geringe Energiedrift des Lasers über längere Messungen zu gewährleisten, muss das Laser-Ablationssystem vor jedem Messtag mindestens 60 min vorgewärmt werden.

**Tabelle 16: Laser-Ablations-Parameter zur Analyse von Gewebeschnitten**

Spotdurchmesser	100 µm eingestellt (85 µm real)
Scangeschwindigkeit	150 µm/s
Schussfrequenz	10 Hz
Energiedichte	1,5 J/cm <sup>2</sup>
Linienabstand	75 µm
Auswaschverzögerung	20 s
Aufwärmzeit	15 s

Die Aufnahme der Daten erfolgt als zeitaufgelöste Messung. Durch Ermittlung der Scanzeit über mehrere gleichlange Linienscans kann die durchschnittliche Dauer eines Linienscans errechnet werden. Bei bekannter Scangeschwindigkeit wird die Zeitachse in eine Längenkoordinate umgerechnet. Die Nummer des parallelen gleichlangen Linienscans wird, da der Linienabstand immer gleich bleibend ist, in die Breitenkoordinate umgerechnet. Auf diese Weise kann jedem Messwert eine Längen(X)- und Breite(Y)-koordinate zugeordnet werden, so dass eine Darstellung im Format XYZ mit Z als Messwert möglich ist.

Um eine hohe zeitliche Auflösung der Messung zu erreichen, werden Integrationszeiten von 0,01 s gewählt und die Anzahl der zu untersuchenden Isotope auf unter 15 gehalten.

### **3.5.11 Kultivierung der CHO-Zellen und deren Aufbringung auf Objektträger**

Die Arbeiten der Zellkultur der CHO-Zellen, die Inkubation mit cis-Platin und die Zellpräparation bis zum Aufbringen auf die Objektträger wurden von Herrn PD Dr. Wolfgang Goedecke übernommen.

#### **3.5.11.1 Zellkultur und Zugabe von cis-Platin**

Die verwendeten CHO-Zellen werden in McCoy's Medium<sup>[151]</sup> (cc pro GmbH, Oberdorla) mit 10% fötalem Kälberserum (FKS) (Biochrom AG, Berlin) kultiviert. Zur Vermeidung bakteriellen Wachstums wird das Medium mit 10 Einheiten pro mL Penicillin (c c pro GmbH, Oberdorla) und 0,01 mg Streptomycin pro mL beaufschlagt.

Die Kultivierung erfolgt bei 37 °C und unter 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Die Teilung der Kultur erfolgt alle drei Tage bei 90% Konfluenz im Verhältnis 1:5.

Die Zugabe von je 2,5 µL, 5 µL, 7,5 µL und 10 µL 16,6 mM *cis*-Pt gelöst in DMSO zu 10 mL Medium erfolgt ca. 12 h nach dem Teilen der Kultur bei einer Zellkonzentration von 10<sup>5</sup> Zellen pro 10 cm durchmessender Petrischale. Nach einer Stunde Einwirkzeit wird das *cis*-Pt haltige Medium verworfen, zwei mal mit frischem Medium ohne *cis*-Pt gespült und anschließend für 24 h bei 37 °C und unter 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre weiterkultiviert, bevor mit der Präparation der Zellen begonnen wird.

### 3.5.11.2 Präparation der Meta- und Interphasen

Zur Metaphasenpräparation wird den CHO-Zellen 2 h vor der Ernte 0,08 µg/ml Colcemid (c c pro GmbH, Oberdorla) zugesetzt. So wird der Zellzyklus in der Metaphase angehalten und die Chromosomen örtlich verteilt. Bei der Darstellung von Interphasen kann dieser Schritt entfallen.

Um die Zellen präparieren zu können, müssen sie zunächst vom Substrat abgelöst werden, dies geschieht durch zweimaliges Waschen mit PBS-Lösung (Invitrogen Ltd, Paisley, UK), anschließender 30 s Trypsinierung mit 1% Trypsin in PBS. Durch Zugabe von McCoy's Medium<sup>[151]</sup> mit 10% FKS wird die Trypsinierung gestoppt und die Zellen durch 10 min Zentrifugation bei 1000 g vom Überstand getrennt. Dieser wird verworfen und die Zellen in 8 mL 1 % KCl für 5 min hypoton geschockt. Danach wird erneut 10 min bei 1000 g zentrifugiert und die Zellfraktion mit frisch angesetzter 3:1 Methanol/Essigsäure fixiert. Über Nacht (für mindestens 12 Stunden) werden die Zellen bei 4 °C stehengelassen und am nächsten Tag auf 4 °C kalte feuchte Objektträger aufgetropft, so dass die Zellen auf der Oberfläche haften bleiben.

### 3.5.11.3 RNase- und Pepsinbehandlung der Zellen zum RNA- bzw. Proteinverdau

Bei einigen Fragestellungen ist eine Weiterbehandlung der Zellen durch den Verdau der Zellproteine und der RNA notwendig. In diesen Fällen findet eine Behandlung mit 1 µg/mL RNase A (Roche Deutschland Holding GmbH) und/oder 1 µg/mL Pepsin (Sigma-Aldrich Handels GmbH, Wien, A) statt.

Bei kombiniertem Verdau wird erst mit RNase A und anschließend mit Pepsin verdaut, um einen Verdau der RNase A mit der Protease zu vermeiden.

Vor dem Verdau werden die Zellen kurz mit 50% Aceton gewaschen, um die Zellmembrantrümmer, die durch den hypotonen Schock der Zellen entstanden sind, zu entfernen, damit das Zellinnere zugänglicher für die Enzyme wird. Nach gründlichem Spülen mit Reinstwasser wird der Objektträger 1 h in PBS inkubiert, um die Zellen quellen zu lassen und anschließend mit Enzymlösung und einem Deckglas über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag werden die Objektträger zuerst mit PBS gewaschen, um die verdauten RNA- und Proteinreste zu entfernen und anschließend gründlich mit Reinstwasser abgespült, um das PBS zu entfernen.

#### **3.5.11.4 GIEMSA-Färbung der Zellen auf dem Objektträger**

Um die Chromosomen und Zellkerne besser unter dem Mikroskop bzw. dem LA-System erkennen zu können, müssen sie gefärbt werden. Hierzu werden die mindestens 24 h bei Raumtemperatur getrockneten Objektträger mit 5 % GIEMSA-Lösung (Merck KGaA, Darmstadt) in PBS für 20 min gefärbt. Zur Entfernung des PBS-Puffers von den Objektträgern wird anschließend mehrmals gründlich mit je 5 mL Reinstwasser gespült und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet.

#### **3.5.12 Methode zur Untersuchung einzelner Zellen mittels LA-ICP-MS**

Da für die Untersuchung von einzelnen Zellen eine möglichst große Sensitivität der ICP-MS von Nöten ist, werden vor jedem Messtag das gesamte Vakuuminterface sowie die Ionenlinsen gereinigt und die LA-ICP-MS auf maximale Sensitivität getunt. Nach dem Einlegen des Probenträgers in die Ablationskammer wird die Kammer für 20 Minuten mit Helium gespült. Hierdurch wird der Hintergrund auf  $m/z$  31, der für die Messungen des Phosphorgehalts in Zellen störend ist, auf ein Minimum reduziert. Während des Spülens werden bereits mittels der Laser-Ablationssoftware die Schusspositionen entsprechend der zu untersuchenden Zellen programmiert. Um ein repräsentatives Ergebnis zu erhalten, werden aus jeder Probe jeweils 50 Zellen gewählt.

Die Messung mittels LA-ICP-MS erfolgt im zeitaufgelösten Modus. Um ein vollständiges Auswaschen des entstandenen Aerosols aus der Ablationskammer zu

gewährleisten, wird nach jedem Laserschuss, also nach jeder ablierten Zelle, eine Auswaschverzögerung von 25 s programmiert. Vor jedem Laserschuss wird eine Aufwärmphase von 5 s gewählt, um eine einheitliche Energiedichte der jeweiligen Schüsse zu erzielen.

Die verwendeten Geräteparameter sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

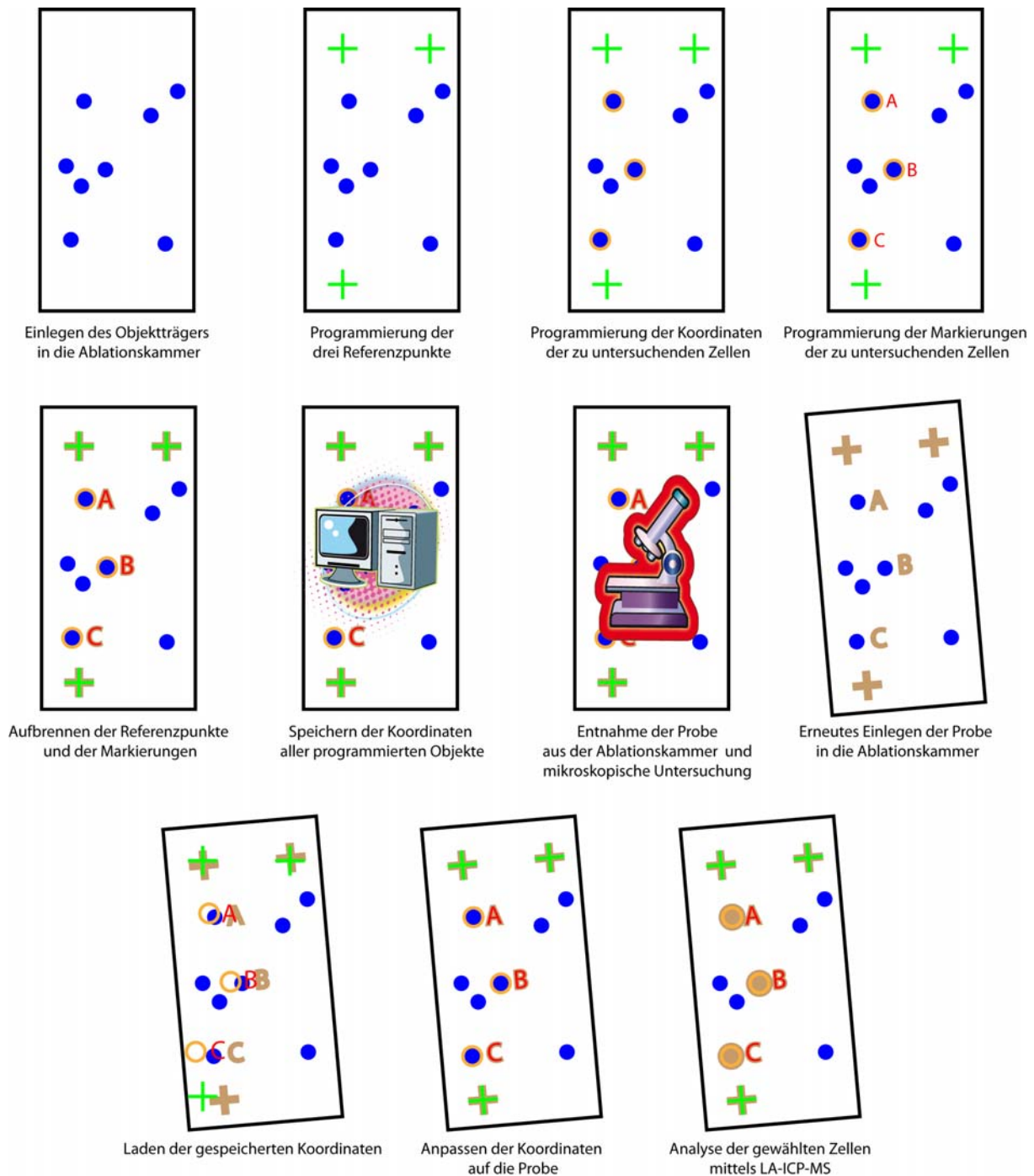
**Tabelle 17: Geräteparameter zur Einzelzellenuntersuchung mittels LA-ICP-MS**

ICP-MS RF-Power	1500 W
ThO/Th	< 1%
Elemente (Integrationszeiten)	<sup>31</sup> P (0,01s); <sup>194</sup> Pt (0,1s), <sup>195</sup> Pt (0,1s)
Vorwärmphase	5 s
Auswaschverzögerung	25 s
Schussfrequenz	1 Hz
Analysendauer	1 s
Laserstrahldurchmesser	50 µm
Energiedichte	1 J/cm <sup>2</sup>

### **3.5.13 Sequenzielle Untersuchung spezifischer einzelner Zellen mittels optischer Mikroskopie und LA-ICP-MS**

Zur lichtmikroskopischen Auswertung von Zellen und anschließender Untersuchung mittels LA-ICP-MS ist es notwendig, spezifische Zellen auf dem Probenträger wieder finden zu können. Hierzu bedient man sich der Fähigkeit des Lasers, die Proben zu beschriften und zuvor programmierte Positionen wieder anfahren zu können.

Folgende Einzelschritte sind notwendig:



**Abb. 35: Schema zur sequenziellen mikroskopischen und LA-ICP-MS-Untersuchung von einzelnen Zellen auf einem Objektträger (Zeile für Zeile von links nach rechts)**

Als erstes werden drei Referenzpunkte auf den Proben­träger gelasert, die auf einem kalibrierten Bildschirm exakt zueinander koordiniert sind. Sie müssen für das bloße Auge wieder zu finden sein, also zum Beispiel mehrere Millimeter große Kreuze.

Die Position der Kreuze zueinander ist exakt bekannt.

Nach dem Aufbringen der Referenzpunkte wählt man die zu untersuchenden Zellen und programmiert ihre Positionen inklusive der Ablationsparameter. Um sie auch

unter dem Lichtmikroskop wiederfinden zu können, werden sie durch daneben gelaserte Nummern markiert. Das Ablationsmuster wird gespeichert und der Probenträger kann aus der Ablationskammer entfernt und der lichtmikroskopischen Analyse zugeführt werden.

Anschließend wird der Probenträger erneut in die Ablationskammer eingeführt. Es werden nun die Referenzpunkte gesucht, das gespeicherte Ablationsmuster geladen und dieses auf die Referenzpunkte rekoordiniert. Hierbei wird eine Abweichung der Probenträgerlage zum Programmierungszeitpunkt ausgeglichen und die programmierten Positionen exakt den Zellen angeglichen. Danach erfolgt die Untersuchung der Zellen mittels LA-ICP-MS wie in Kapitel 3.5.12, S. 76 beschrieben.

### **3.5.14 Anfertigung der Kalibrationsgelschnitte zur Kalibration des ICP-MS bei der Untersuchung einzelner Zellen**

Zur Herstellung dieser Polyacrylamid-Gele gibt man für 10 mL Gesamtvolumen 2,6 mL einer wässrigen 4 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)-Lösung zu 3,3 mL 30% Acrylamid-Lösung. Zum Anspiken der Gele stehen 4,0 mL zur Verfügung, die je nach gewünschter Konzentration und Analytanzahl durch Elementstandardverdünnungen oder durch Wasser aufgefüllt werden. Zur Kalibration von P und Pt wird eine Verdünnungsreihe in den Schritten 500 µg/mL, 50 µg/mL, 5 µg/mL, 0,5 µg/mL angesetzt. Hierzu gibt man jeweils im Verhältnis 1:1 eine 100 µg/mL Y Standardlösung als internen Standard. Nach gründlichem Schütteln werden je Gel 4,0 mL einer dieser Standardlösungen zu der Acrylamid-TRIS-Lösung gegeben und wiederum gründlich homogenisiert. Zum Start der Polymerisation gibt man schnell 0,1 mL frisch angesetzte 10 % Ammoniumperoxodisulfat-(APS)-Lösung und 4 µL Tetramethylethyldiamin (TMEDA) hinzu und schüttelt. Das noch flüssige Reaktionsgemisch wird nun in 10 mmx10 mmx5 mm große Förmchen (sog. Cryomolds) gegossen, in denen es in 20 - 30 Minuten zugedeckt auspolymerisiert. Anschließend werden die Förmchen auf einem durch flüssigen Stickstoff auf -195 °C gekühlten Aluminiumblock (Abb. 34, S. 72) gestellt und die abreagierten Gele auf diese Weise schockgefroren. Die Kalibrationsgelproben werden wie Gewebeschnitte (Kapitel 3.5.9, S. 72) auf dem Kryomikrotom in 10 µm dicke Scheiben geschnitten.



Um die Polymerisation nicht zu stören, ist es wichtig, eine hohe Pufferkonzentration an TRIS zu verwenden. Hierdurch werden die Säuren der Standardlösungen, die die Reaktion behindern, abgefangen und der pH-Wert in den neutralen bis alkalischen Bereich (pH 7-9) gebracht.

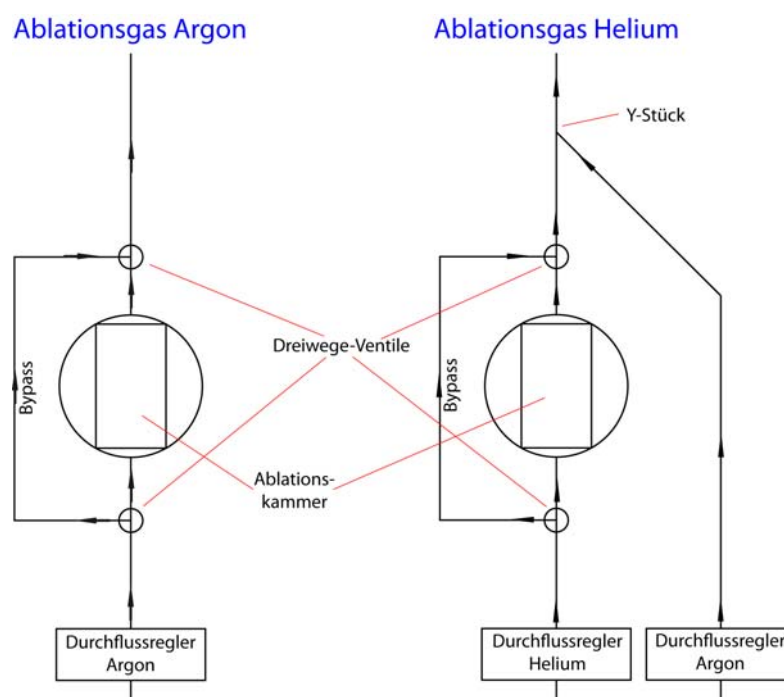
## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Optimierungen des LA-Systems

#### 4.1.1 Einführung von Helium als Ablationsgas

Bei Beginn dieser Arbeit wurde ausschließlich Argon als Ablationsgas verwendet, um eine möglichst gute Kompatibilität des Laser-Ablationssystems mit dem angekoppelten ICP-MS und seinem Argonplasma zu gewährleisten. Die Art des Ablationsgases beeinflusst jedoch massiv den Bildungsprozess des bei der Laser-Ablation entstehenden Feststoffaerosols, wie in Kapitel 2.1.3.2.1, S. 13 beschrieben<sup>[39,79]</sup>.

Zur Optimierung des Laser-Ablationssystems wird daher das Ablationsgas von Argon auf Helium umgestellt. Die genaue Einstellung des Heliumflusses erfolgt über die Software des ICP-MS, da der in diesem bereits vorhandene digital steuerbare Gasflussregler für das optionale Gas benutzt wird. Um den Aufschluss und die Ionisation des Probenaaerosols im Plasma zu verbessern, erfolgt nach der Ablationskammer über ein Y-Stück die Zudosierung eines Argonstroms.



**Abb. 36:** Skizze der Gasströme innerhalb des Laser-Ablationssystems bei der Verwendung von Argon (links) bzw. Helium (rechts) als Trägergas

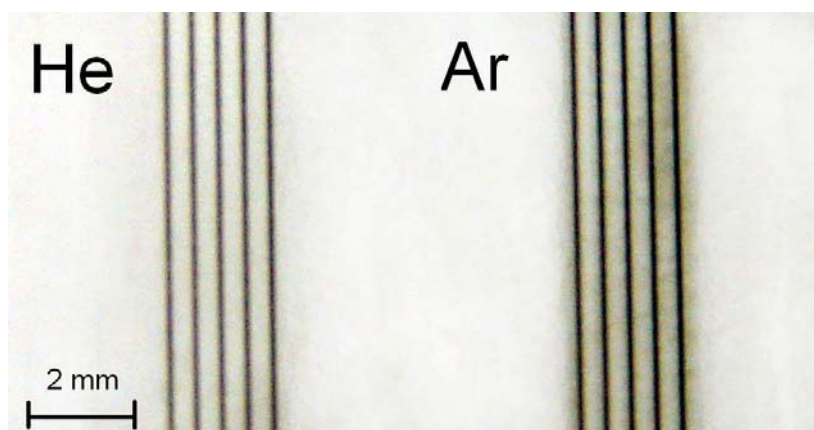
Nach der Ermittlung der optimalen Einstellungen sämtlicher Gasströme und Geräteparameter wird der Einfluss beider Trägergase direkt miteinander verglichen. Hierzu wird das zertifizierte Standardreferenzmaterial NIST 612 „Trace Elements in a Glass Matrix“ unter Verwendung der gleichen Standard-Tune-Ablationsparameter (Tabelle 6, S. 63) sowie der jeweils optimalen ICP-MS-Geräteparameter einmal mit Argon und einmal mit Helium als Trägergas untersucht.

**Tabelle 18: Vergleich der Tuning-Signale für die Ablationsgase Argon und Helium bei der Untersuchung von NIST 612**

NIST 612	Trägergas Argon		Trägergas Helium		Vergleich He/Ar
	Intensität [cps]	RSD [%]	Intensität [cps]	RSD [%]	
Tunemasse m/z 11 (B)	17530	8,8 %	33350	4,19 %	1,90
Tunemasse m/z 88 (Sr)	122190	6,76 %	225302	2,59 %	1,84
Tunemasse m/z 238 (U)	76585	7,43 %	192225	2,46 %	2,51

In der direkten Gegenüberstellung beider Ablationsgase kann für Helium über den gesamten Massenbereich eine Steigerung der Sensitivität um ca. den Faktor zwei beobachtet werden. Dies entspricht der aus der Literatur bekannten Steigerung um einen Faktor von zwei bis vier<sup>[39]</sup>.

Helium besitzt eine rund neunmal höhere Wärmeleitfähigkeit ( $0,1567 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$ <sup>[87]</sup>) als Argon ( $0,0179 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$ <sup>[87]</sup>). Dadurch kühlt das verdampfte Probenmaterial schneller ab und das kondensationsbedingte Wachstum der ausfallenden Partikel bricht früher ab<sup>[52]</sup>. Die Folge ist eine feinere Partikelgrößenverteilung des Aerosols und damit eine bessere Transporteffizienz ins Plasma des ICP-MS<sup>[79]</sup>. Ebenso werden die Partikel besser im Plasma des ICP-MS aufgeschlossen und ionisiert<sup>[44]</sup>, so dass insgesamt eine höhere Sensitivität erreicht wird.



**Abb. 37:** Mit Argon als Ablationsgas (rechts) setzt sich auf Grund einer gröberen Partikelgrößenverteilung neben der Ablationsspur deutlich mehr Material aus der Gasphase ab als bei der Verwendung von Helium (links)

Ebenso weisen die erhaltenen Signale bei Helium eine geringere Standardabweichung (2,5-5 %) auf als bei Argon (>6,5%). Dies kann ebenfalls als eine Folge der feineren Partikelgrößenverteilung der Ablation und des damit verbundenen, optimierten Verhaltens im Plasma gedeutet werden.

Die Bildungsraten molekularer, isobarer Interferenzen sowie doppeltgeladener Ionen sind unabhängig vom Ablationsgas weiterhin auf einem niedrigen Niveau. Auch das Rauschen des Detektors wird nicht beeinflusst.

**Tabelle 19: Vergleich der Trägergase Argon und Helium bei der Untersuchung von NIST 612 (Bildungsraten der Oxide und doppelt geladenen Ionen sowie Detektorrauschen)**

Ablationsgas	Argon	Helium
Oxidbildungsrate ThO/Th (m/z 248 / m/z 232)	0,44 %	0,31 %
Doppeltgeladene Pb <sup>2+</sup> /Pb <sup>+</sup> (m/z 104 / m/z 208)	0,24 %	0,28 %
Detektorrauschen (m/z 260)	2,1 cps	1,0 cps

#### 4.1.2 Verwendung eines neuen Standards zur Einstellung der P/A-Faktoren

Nach dem Ermitteln der optimalen Sensitivitätseinstellungen der LA-ICP-MS sollten die P/A-Faktoren idealerweise messtäglich, auf jeden Fall aber nach einem Tune des

Detektors eingestellt werden. Bislang war es auf Grund eines fehlenden geeigneten Standards nicht möglich, diese während der Kopplung des Laser-Ablationssystems mit der ICP-MS einzustellen, so dass zur Einstellung auf den Flüssigkeitsmodus der ICP-MS zurückgegriffen werden musste.

Nach dem Erwerb des zertifizierten Standardreferenzmaterials NIST 610 „Trace Elements in a Glass Matrix“<sup>[110]</sup> mit einer nominellen Spurenelementkonzentration von 500 mg/kg konnte festgestellt werden, dass bei dessen Analyse mittels LA-ICP-MS unter Verwendung der Standard-Tuneparameter der LA auch bei trockenem Plasma für eine Vielzahl an Isotopen Signalintensitäten erreicht werden, die ein Einstellen der P/A-Faktoren über den gesamten Massenbereich des PSE ermöglichen.

**Tabelle 20: Geeignete Isotope im SRM NIST 610 zur Bestimmung der P/A-Faktoren unter Standardtuneparametern**

<b>Element</b>	<b>m/z</b>	<b>Element</b>	<b>m/z</b>
Li	7	Sr	88
Ne	20	In	115
Mg	24	Pr	141
S	32	Tm	169
K	39	Ta	181
Sr	45	Bi	209
Mn	55	U	238
Ga	69		

Gegenüber dem Einstellen der P/A-Faktoren im Flüssigkeitsmodus erfolgte die Bestimmung für eine wesentlich höhere Anzahl an Elementen, was eine dichtere Abdeckung des gesamten Massenbereichs des PSE zur Folge hat. Die Einstellung erfolgt also genauer. Auch erfolgt die Einstellung unter Verwendung desselben Geräteaufbaus, derselben Plasmabedingungen und Laserparameter, so dass die Einstellung ohne zeitaufwändigen Umbau auskommt und unter Analysenparametern erfolgt, wie sie für eine valide Analytik sinnvoll sind.

### 4.1.3 Verkleinerung der Ablationskammer

Die gekaufte Version des Laser-Ablationssystems enthält eine Ablationskammer mit einem relativ großen Volumen von  $33,82 \text{ cm}^3$ <sup>[157]</sup>. Ein großes Volumen hat deutliche Nachteile in Bezug auf die Überführung des Aerosols und die Qualität der zeitaufgelösten LA-ICP-MS-Messungen<sup>[93]</sup>. Deshalb wird das Volumen der Ablationskammer soweit reduziert, wie es ohne einen kostenintensiven Umbau möglich ist. Hierzu wird das Design des Einsatzes in der Ablationskammerschublade geändert. Dies bringt eine Reduktion des Ablationskammervolumens um 19,3% auf  $27,3 \text{ cm}^3$ .



Abb. 38: Ablationskammerschublade mit altem Originaleinsatz



Abb. 39: Ablationskammerschublade mit neuem, volumenreduzierendem Einsatz

#### 4.1.3.1 Aufnahme des orts aufgelösten Auswaschverhaltens des Aerosols aus der Ablationskammer

Um den Effekt des geänderten Designs beurteilen zu können, wird jeweils das Auswaschverhalten der beiden Zellen orts aufgelöst analysiert. Zu dieser Charakterisierung der Ablationskammern wird ein Gitter (Breite: 24 mm; Höhe: 46 mm; Gitterabstand: 1,5 mm) aus Einzellaserpulsen über den kompletten Analysenbereich der Ablationskammer programmiert (Beispiel: Abb. 41, S. 87).

Als Probe dient ein mit einer sauberen PVDF-Membran bespannter Objektträger. Die Analyse erfolgt anhand der Aufnahme des  $^{13}\text{C}$ -Signals bei konstanten Laser- und ICP-MS-Parametern (Methodenteil Kapitel 3.5.2, S. 64). Bei der Auswertung betrachtete Parameter sind das Integral, die Spitzenintensität, die Halbwertszeit, die Zehntelwertszeit und die Halbwertsbreite sowie die Zehntelwertsbreite des Signals (Abb. 40). Zusätzlich werden noch die Signalintensitäten von Linienscans zum direkten Vergleich herangezogen.

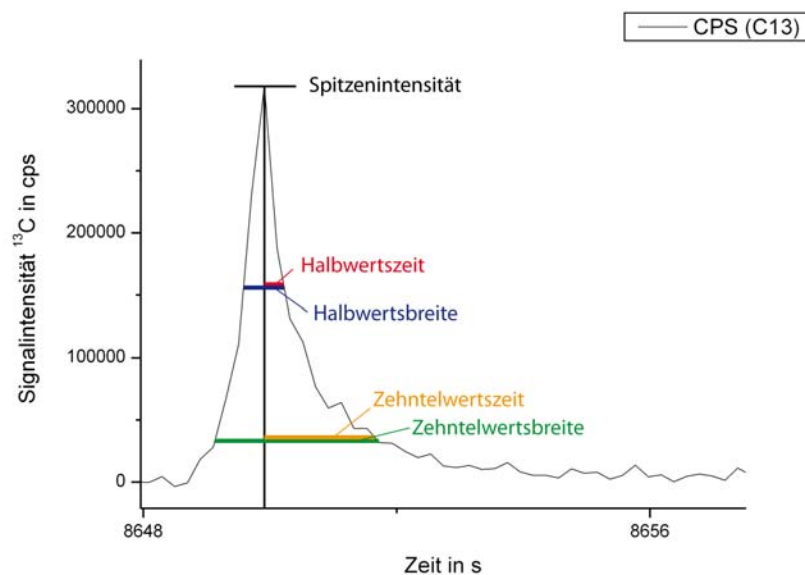
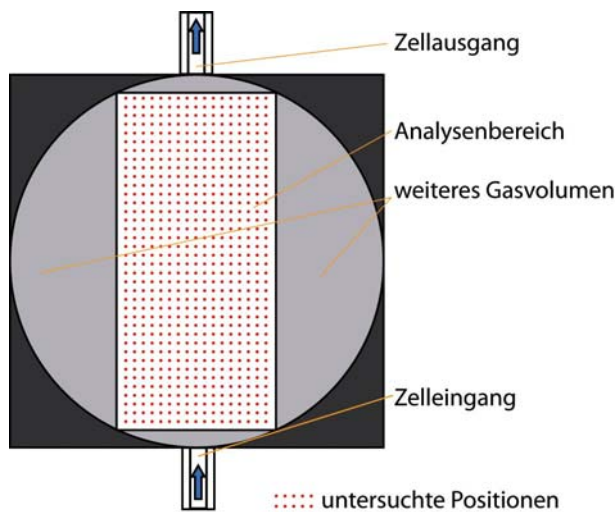


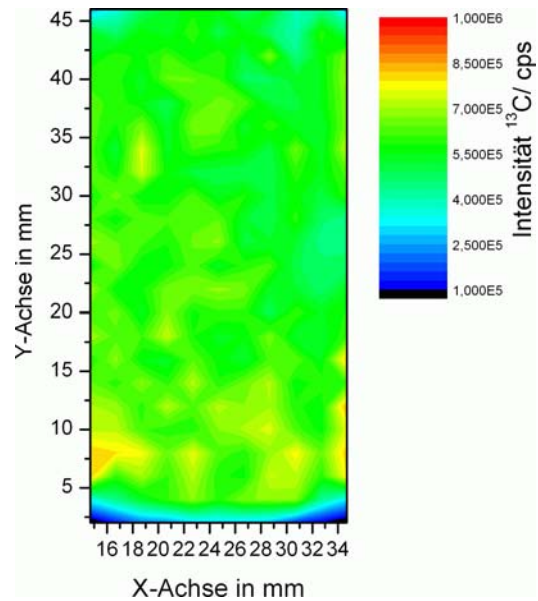
Abb. 40: Betrachtete Parameter zur Analyse des Auswaschverhaltens (ohne Signalintegral)

#### **4.1.3.1.1 Charakterisierung der Analyseigenschaften der ursprünglichen Ablationskammer**

Die orts aufgelöste Auswertung der Einzelschussanalysen ergibt für die Signalintegrale über den gesamten Analysenbereich weitgehend konstante Werte mit einer geringfügigen Abnahme der Integrale in Richtung des Zellausgangs (oben) sowie jeweils niedrigeren Werten in allen vier Ecken.



**Abb. 41:** Skizze der Ablationskammer mit den untersuchten Positionen zur Bestimmung der Integrale



**Abb. 42:** Ortsaufgelöste Darstellung der  $^{13}\text{C}$ -Integrale der Einzelschussanalysen über den gesamten Analysenbereich der Originalablationskammer

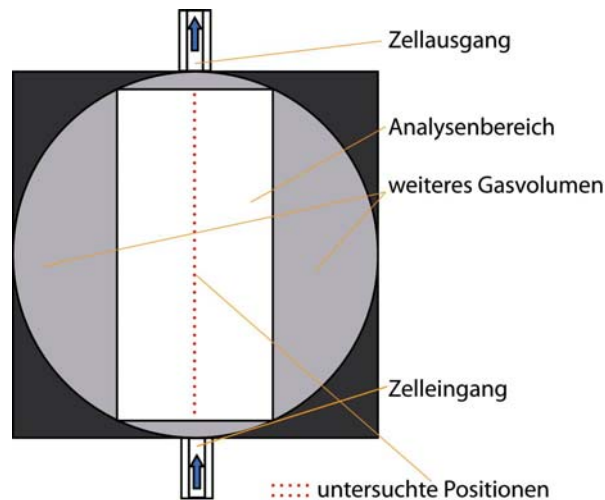
Die leichte Abnahme von unten nach oben ist jedoch lediglich die Folge der Energiedichtedrift des Lasers während der Aufnahme der Messwerte, da diese ebenfalls Zeile für Zeile von unten nach oben in Richtung auf den Zellausgang zu erfolgte. Unter Berücksichtigung der Energiedichtedrift kann daher festgestellt werden, dass die Signalintegrale über den gesamten Analysenbereich bis auf in den oberen und unteren Randzonen konstant sind. Daraus folgt, dass auch die Überführungsrate des Aerosols unabhängig vom Analysenort ist.

Um die Energiedichtedrift des Lasers zu vermeiden, sollte eine automatische Nachführung der Energiedichte eingerichtet werden oder zumindest eine längere Vorwärmzeit (>60 min) für den Laser gewählt werden.

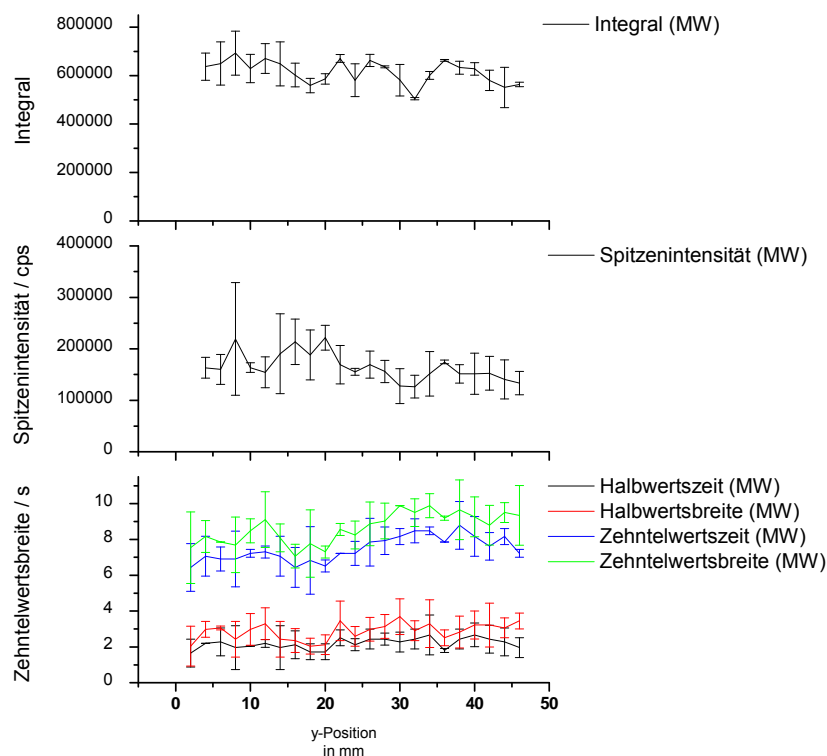
Die Abnahme der Integrale in den vier Ecken lässt sich durch die runde Form des Ablationskammerfensters erklären. Der Rand des Fensters blendet an den Ober- und Unterkanten des Analysenbereichs einen Teil des Laserstrahls aus, so dass dort weniger Energie auf die Oberfläche übertragen wird und als Folge weniger Material abliert werden kann. Die oberen und unteren Millimeter des Analysenbereichs sollten deshalb nicht für Analysen gebraucht oder alternativ ein größeres Ablationskammerfenster installiert werden.



Die Untersuchung des Auswaschverhaltens (entlang der y-Achse) in der Mitte der Ablationskammer in Gasflussrichtung auf den Zellausgang zu (siehe Abb. 43) ergibt in Richtung Ausgang eine minimale Abnahme der Integrale (siehe Abb. 44). Dies kann, wie bereits oben beschrieben, auf eine leichte Energiedichtedrift des Lasers während der Analyse zurückgeführt werden.



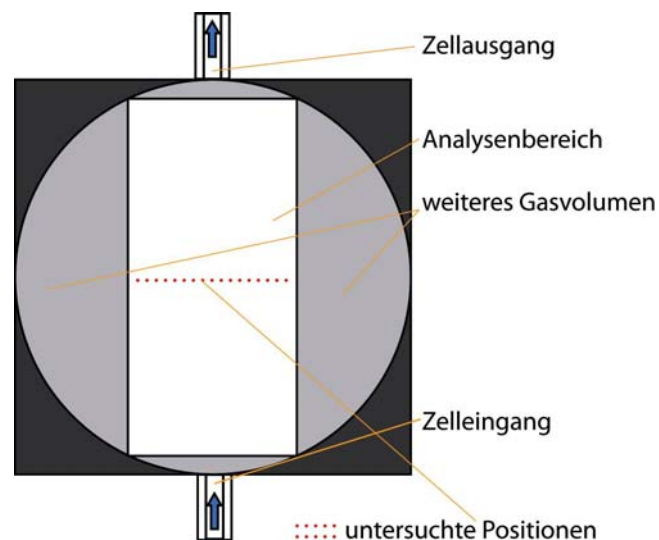
**Abb. 43:** Skizze der untersuchten Positionen in der Mitte der Ablationskammer in Gasflussrichtung auf den Zellausgang zu



**Abb. 44:** Auswaschverhalten der Originalablationskammer entlang der Mittelachse in Gasflussrichtung auf den Zellausgang zu

Die Spitzenintensitäten zeigen eine leicht abnehmende Tendenz auf den Zellausgang zu. Diese geht mit einer leichten Verbreiterung der Signale einher, wie insbesondere aus den Zehntelwertszeiten und -breiten hervorgeht (Anstieg von ca. 1-2 s). Die Halbwertszeiten und -breiten zeigen diesen Trend nicht auf, da er innerhalb der Schwankungsbreite der Werte untergeht.

Bei der Untersuchung des Auswaschverhaltens quer zur Gasflussrichtung (siehe Abb. 45) ist ein zur Mitte hin asymmetrisches Auswaschverhalten festzustellen, das im Gegensatz zur Symmetrie der Ablationskammer steht (siehe Abb. 46).

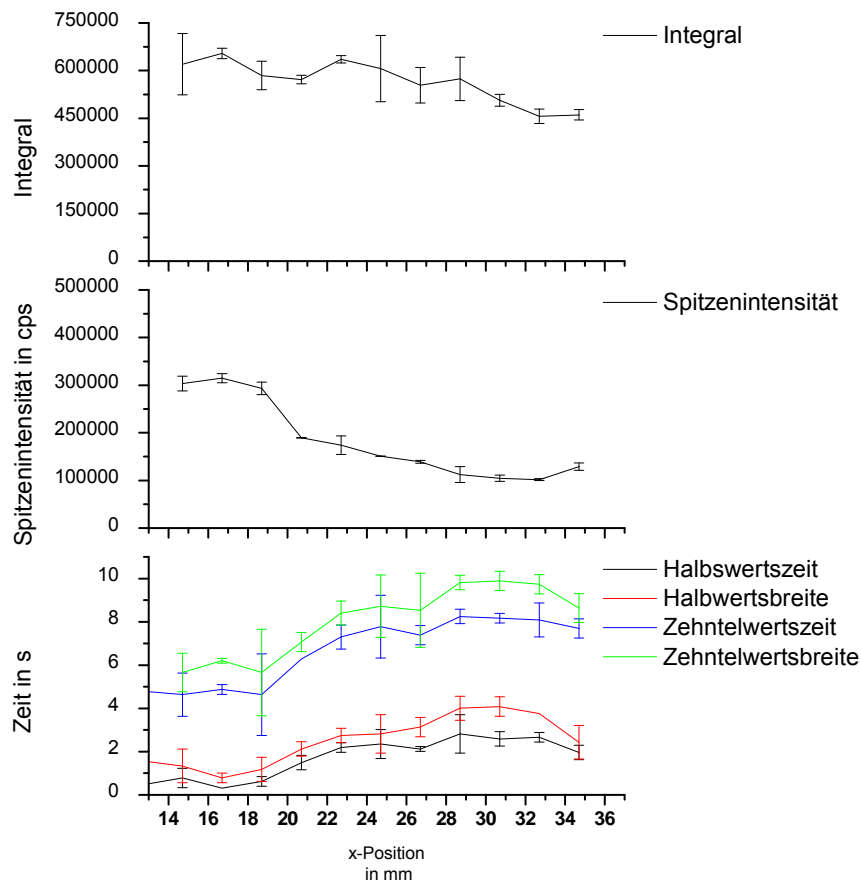


**Abb. 45:** Skizze der untersuchten Positionen in der Mitte der Ablationskammer quer zur Gasflussrichtung

Die Signale werden von der rechten Seite des Analysenbereichs zur linken hin immer breiter und niedriger, wobei sich an beiden Seiten (x-Positionen: 13 bis 19 mm und 29 bis 35 mm) ein Zone konstanter Werte befindet. Die Halbwertszeiten steigen von links ca. 0,5 s auf rechts über 2 s an, die Zehntelwertszeiten von links ca. 5 s auf rechts ca. 8 s. Das Integral nimmt währenddessen ebenfalls leicht ab. Diese Abnahme lässt sich mit der Abnahme der Energiedichte während der Messung erklären, zumal sich dieser Trend, wie bereits beschrieben, auch in der Vertikalen beobachten lässt.

Die Ausbildung der Stufe im Auswaschverhalten in der Mitte der Ablationskammer lässt sich nur durch einen nicht symmetrischen Gasfluss in der Ablationskammer erklären, der dafür sorgt, dass sich im Analysenbereich eine Totzone mit

schlechterem Auswaschverhalten und schlechterer Überführungseffizienz ausbildet. Möglicherweise ist die Geometrie des Gaseinlasses in der Ablationskammer dafür verantwortlich.



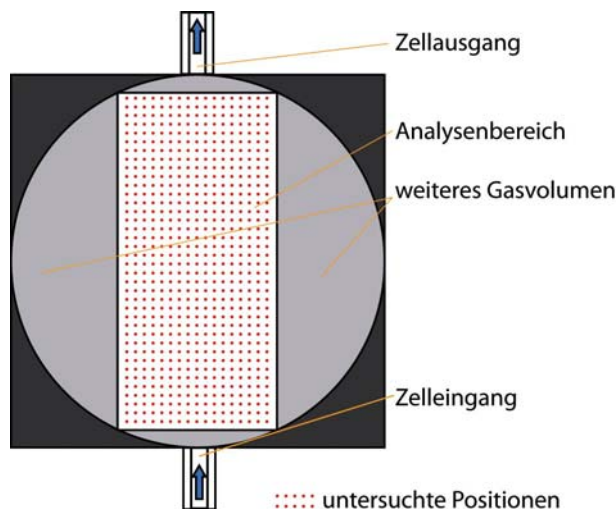
**Abb. 46:** Auswaschverhalten der Originalablationskammer entlang der Mittelachse quer zur Gasflussrichtung von rechts nach links

Zur Originalablationskammer lässt sich zusammengefasst sagen, dass die Überführungseffizienz des Aerosols im Analysenbereich überall annähernd gleich ist. Das Auswaschverhalten hingegen unterscheidet sich jedoch deutlich, je nachdem welche x-Position untersucht wird. Von der y-Position ist kein großer Einfluss auf das Auswaschverhalten festzustellen.

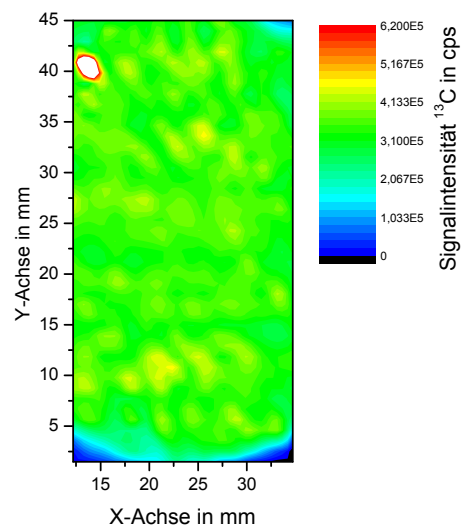
#### 4.1.3.1.2 Charakterisierung der Analyseigenschaften der optimierten Ablationskammer

Da das Volumen direkten Einfluss auf das Auswaschverhalten des lasergenerierten Probenaaerosols hat, wurde ein neuer Einsatz für die Ablationskammerschublade entwickelt. Dieser reduziert das effektive Ablationskammervolumen von 33,82 cm<sup>3</sup> auf 27,3 cm<sup>3</sup> (Abb. 38, S. 85).

Die orts aufgelöste Analyse mittels Einzelschüssen zeigt für die Integrale eine über den gesamten Analysenbereich konstante Überföhrungseffizienz (Abb. 48). Einzig am oberen und unteren Rand des Analysenbereiches brechen die Integrale ein. Dies ist wie bei der Originalzelle durch ein teilweises Ausblenden des Laserstrahls durch den Rand des Lasereintrittfensters bedingt, in dessen Folge weniger Probenmaterial abliert werden kann.

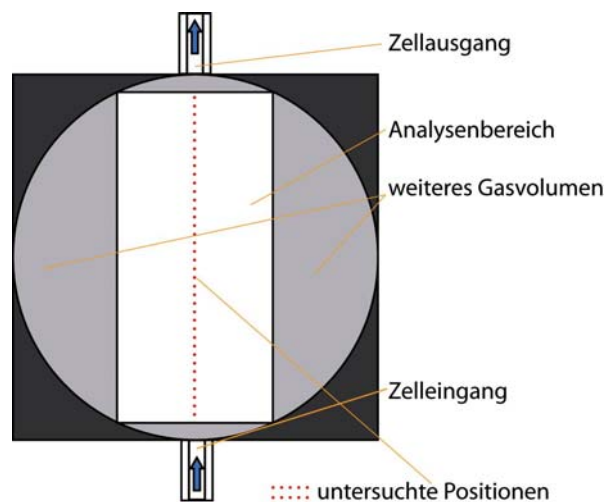


**Abb. 47:** Skizze der untersuchten Positionen für die Bestimmung der Signalintegrale in der Ablationskammer

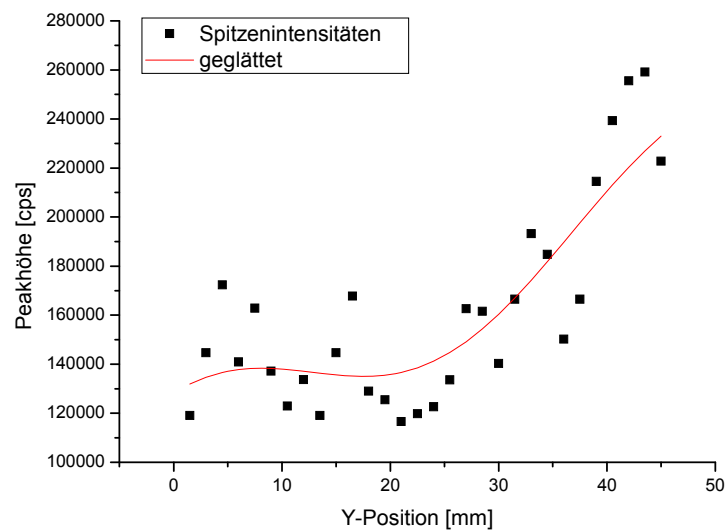


**Abb. 48:** Orts aufgelöste Darstellung der <sup>13</sup>C-Signalintegrale mit dem volumenreduzierten Ablationskammerdesign

Betrachtet man die Spitzenintensitäten der Signale der Einzelschussanalysen entlang der X-Mittelachse in Gasflussrichtung auf den Zellausgang zu (siehe Abb. 47), so ist zu erkennen, dass die Spitzenintensitäten ab etwa der Hälfte der Zelle zunehmen (Abb. 50).

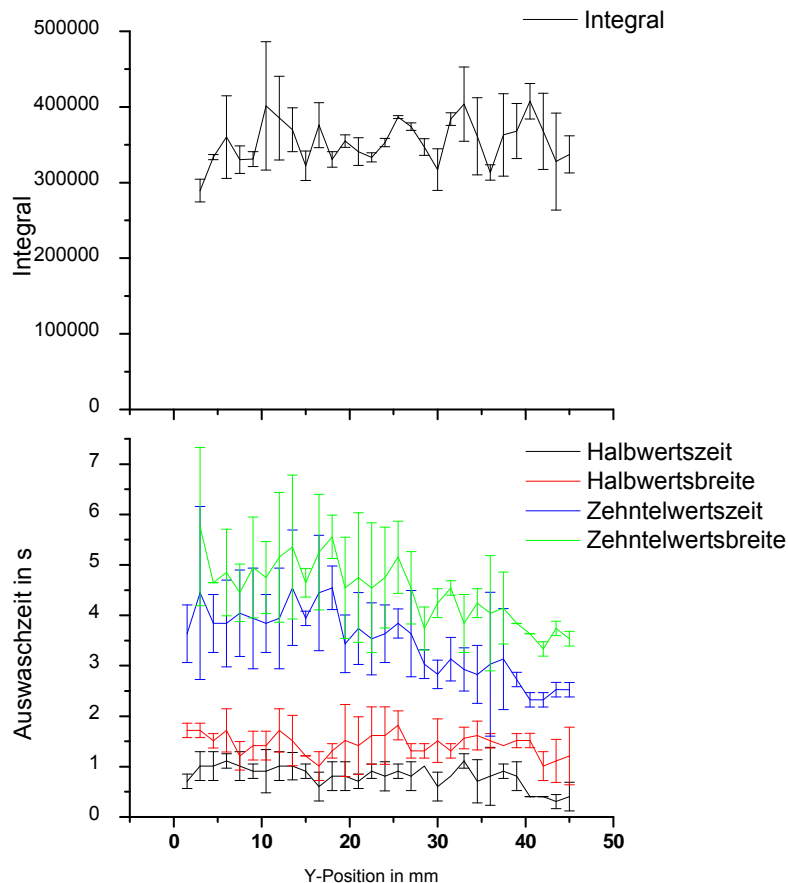


**Abb. 49:** Skizze der untersuchten Positionen in der Mitte der Ablationskammer in Gasflussrichtung auf den Zellausgang zu



**Abb. 50:** Spitzenintensitäten der  $^{13}\text{C}$ -Signale in der Mittelachse in Gasflussrichtung vom Gaseinlass in Richtung Zellausgang

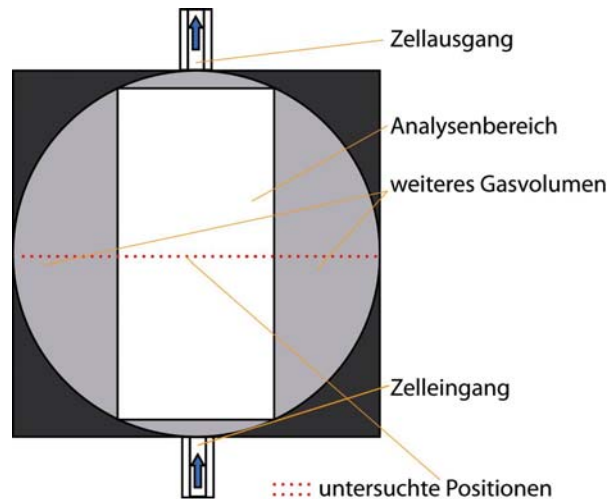
Da die Signalintegrale jedoch wie oben erwähnt konstant bleiben, bedeutet dies, dass es zu einem schnelleren Auswaschen des Aerosols in der Nähe des Zellausgangs kommen muss.



**Abb. 51: Auswaschverhalten und Signalintegrale der optimierten Ablationskammer entlang der X-Mittelachse in Gasflussrichtung von unten nach oben**

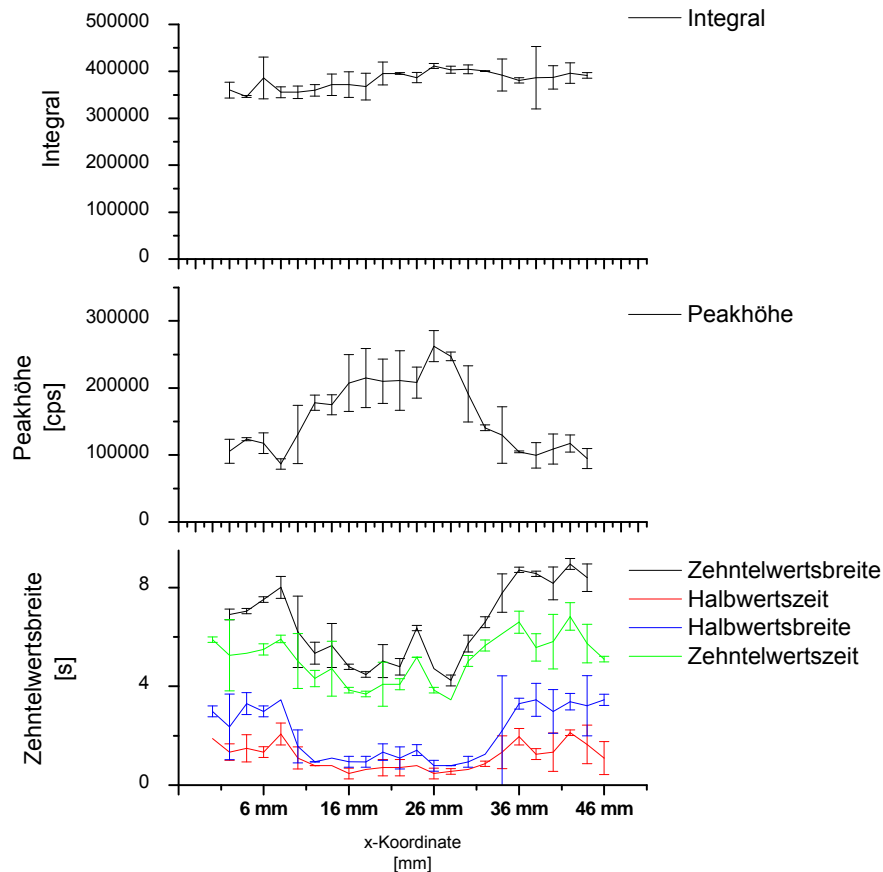
Betrachtet man die Auswaschzeiten und –breiten (Abb. 51) so wird die schnellere Überführung des Probenaerosols direkt bestätigt, da die Zehntelwertszeiten von etwa 4 s auf 2,5 s und die Halbwertszeiten von ca. 1 s auf unter 0,5 s sinken.

Die Aufnahme der Spitzenintensitäten quer zur Flussrichtung über den gesamten Zelldurchmesser (Abb. 52) zeigen im Analysenbereich (12 mm bis 32 mm der x-Koordinate) ca. doppelt so hohe Werte, während neben dem Analysenbereich geringere aber ebenfalls konstante Spitzenintensitäten registriert werden (Abb. 53, S. 95).



**Abb. 52:** Skizze der untersuchten Positionen in der Mitte der Ablationskammer quer zur Gasflussrichtung

Die Aufnahme des Auswaschverhaltens über die gesamte Breite der Ablationskammer zeigt in etwa in der Region des Analysenbereichs eine deutliche Abnahme aller Auswaschparameter (Zehntelwertsbreite von ca. 8 s auf ca. 5 s; Halbwertsbreite von 3 s auf ca. 1 s). Dies stimmt mit den Erwartungen aus den erhöhten Spitzenintensitäten im Analysenbereich bei konstantem Signalintegral überein und ist in etwa um die Zellenmitte spiegelsymmetrisch.

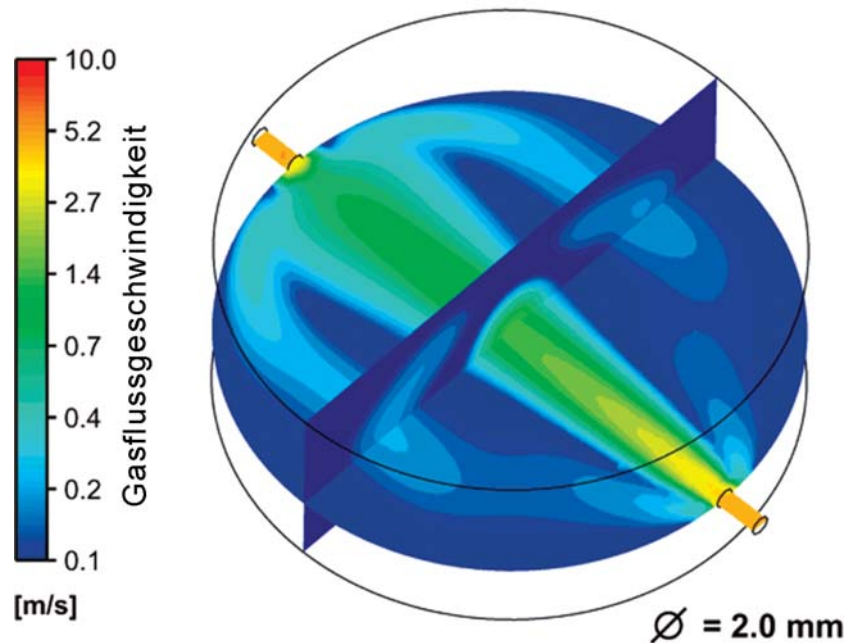


**Abb. 53:** Gemessene Parameter zur Beurteilung des Auswaschverhaltens der verbesserten Ablationskammer (Querprofil entlang der x-Achse (Positionen: 0 bis 46 mm) in der Kammermitte)

Da die Grundform dieselbe ist, lässt sich vermuten, dass in der verwendeten Ablationskammer trotz geringfügiger Unterschiede im Versuchsaufbau ähnliche Strömungsverhältnisse herrschen, wie die durch Koch et al. simulierten Strömungsgeschwindigkeiten innerhalb einer zylindrischen Ablationskammer<sup>[90]</sup>(siehe Abb. 54).

Betrachtet man die gemessene Verteilung der Halbwertszeiten, so lassen sich die Ergebnisse durch einen Vergleich mit dem simulierten Strömungsmodell schlüssig erklären.





**Abb. 54:** Simuliertes Strömungsbild in einer zylindrischen Ablationskammer mit 1 L/min Helium und 2 mm Einlassdüse (zu sehen: laminare Strömungsbedingungen)<sup>[90]</sup>

In direkter Linie vom Gaseinlass zum Zellausgang fließt das Ablationsgas am schnellsten. Im Unterschied zur Simulation besitzt die verwendete Ablationskammer jedoch nicht nur eine einzige Einlassdüse gegenüber dem Zellausgang, sondern noch zwei weitere, äquivalente im Abstand von je ca. 1 cm rechts und links neben dem zentralen Einlass, so dass sich vermuten lässt, dass der zentrale Gasstrom breiter wird und der gesamte Analysenbereich durch den schnellen Gasstrom abgedeckt wird. Das in diesem Strom entstehende Probenaaerosol hat also die Möglichkeit auf schnellstem Weg die Kammer zu verlassen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen, dass die Auswaschzeiten im zentralen Bereich am kürzesten sind und die Signalintensitäten am höchsten.

Ebenfalls lässt sich erklären, weshalb die Auswaschzeiten zum Zellausgang hin ab- und die Signalintensitäten zunehmen, wie in Abb. 50 und Abb. 51 zu sehen ist. Durch den Vergleich mit dem Strömungsbild kann geschlossen werden, dass dieser Effekt darauf zurückzuführen ist, dass das nahe dem Kammerausgang entstehende Probenaaerosol zu einem größeren Anteil direkt im ersten Anlauf aus der Kammer ausgetragen wird, als es bei weiter entfernten Ablationsorten im zentralen Strömungskanal der Fall ist.

Betrachtet man das simulierte Strömungsbild, so ist zu erkennen, dass in der Kammermitte rechts und links vom zentralen Gasstrom „tote Punkte“ existieren, an

denen nur sehr geringe Strömungsgeschwindigkeiten herrschen. Diese Punkte, an denen die Auswaschzeiten ein Maximum erreichen müssen, lassen sich auch in den Messungen quer zur Gasflussrichtung (Abb. 53, S. 95) wiederfinden (Positionen 8 mm bzw. 36 mm der x-Koordinate).

Die Ergebnisse machen deutlich, dass das Auswaschverhalten zwar vom Ort der Ablation abhängig ist, jedoch im Analysenbereich keine Unterschiede in den Signalintegralen beobachtet werden können. Für Analysen, bei denen es auf die zeitliche Auflösung der Messung ankommt, wird empfohlen, die Probe in der x-Mittelachse zu positionieren, um ein möglichst schnelles Auswaschen zu erreichen. Desweiteren kann bei nur wenige Millimeter großen Proben die Ablation in der Nähe des Zellausgangs sinnvoll sein, da hier ein noch kürzeres Auswaschverhalten als in der Mitte der Ablationskammer zu finden ist. Bei größeren Proben führt die Nähe zum Zellausgang jedoch zu Unterschieden im Auflösungsvermögen innerhalb der Messung.

#### ***4.1.3.1.3 Vergleich des Auswaschverhaltens der beiden Ablationskammereinsätze***

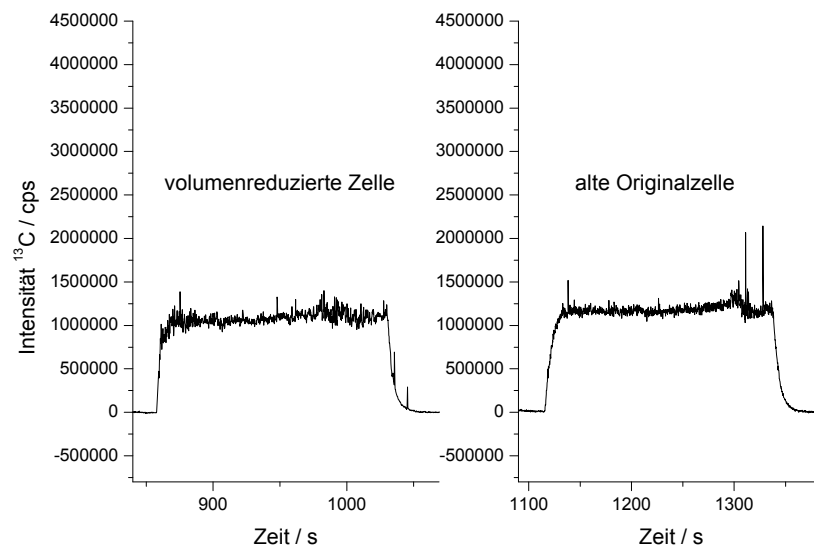
Um eine Veränderung des Auswaschverhaltens durch den geänderten Ablationskammereinsatz festzustellen, werden die oben ermittelten Auswaschparameter beider Einsätze miteinander verglichen (Tabelle 21).

Im direkten Vergleich ist festzustellen, dass der neue Einsatz in allen Bereichen eine Verbesserung des Auswaschverhaltens bewirkt. Teilweise wird die Auswaschzeit sogar halbiert. Die Auswaschzeitenprofile quer zur Flussrichtung zeigen beim optimierten Ablationskammerdesign ein breites Minimum über den gesamten Analysenbereich, während beim Originaleinsatz mittig auf der rechten Hälfte eine Zone schlechten Auswaschverhaltens vorliegt.

**Tabelle 21: Vergleich der Auswaschparameter der beiden Kammerdesigns**

Profil	Kammer	Halbwertszeit	Halbwertsbreite	Zehntelwertszeit	Zehntelwertsbreite
Von unten nach oben	original	1,5 bis 2,5 s	2 bis 3,5 s	6,5 bis 8,5 s	7 bis 10 s
	optimiert	0,4 bis 1 s	1 bis 1,75 s	2,5 bis 4,5 s	3,5 bis 6 s
Von links nach rechts	original	0,5 bis 2,5 s	1 bis 4 s	5 bis 8 s	6 bis 9,5 s
	optimiert	0,5 bis 2 s	0,75 bis 3,5 s	3,5 bis 7 s	4 bis 9 s

Zum direkten Vergleich der Signalintensitäten werden Linienscans mittig in Gasflussrichtung auf den Zellausgang zu von beiden Zellen aufgenommen. Beide Einsätze zeigen eine gleich hohe Signalintensität mit einer ähnlichen Standardabweichung, die auf gleiche Überföhrungseffizienz des lasergenerierten Aerosols deuten.



**Abb. 55: Vergleich von Linienscans in beiden Ablationskammerdesigns zum Vergleich der Signalintensitäten**

#### 4.1.4 Energiedichtedrift des Lasers

Die Energiedichte des Laserpulses ist ein wesentlicher Parameter im Hinblick auf den Ablationsvorgang. Ist sie zu gering, so findet reine Absorption und Reflexion der

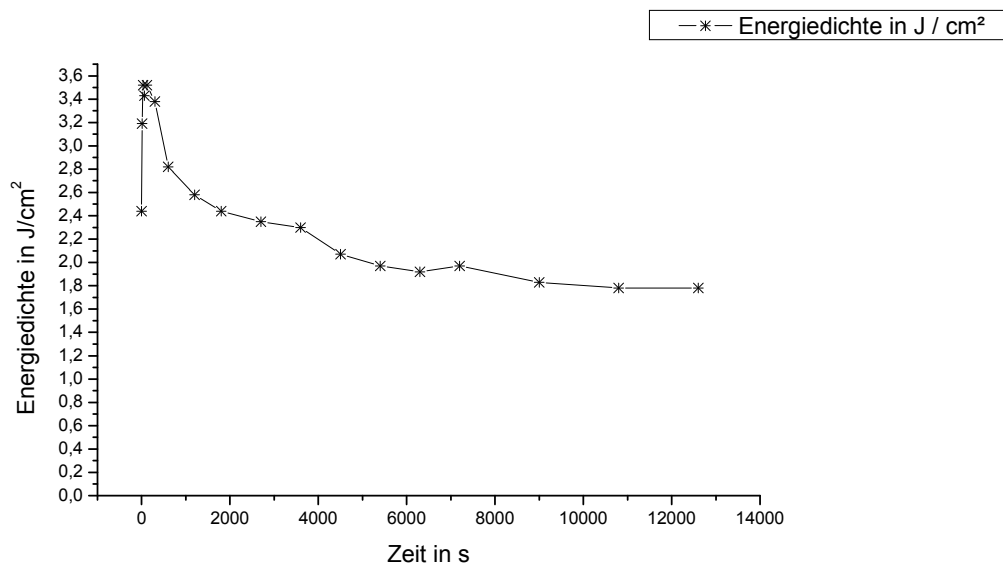
eingestrahlenen Energie statt, so dass die Probenoberfläche lediglich erwärmt wird, ohne dass Probenmaterial verdampft. Bei zu hoher Energiedichte kann es zu ausgeprägtem Plasma Shielding kommen, so dass die Energieübertragung auf den Ablationsort limitiert ist und durch Wechselwirkung des Plasmas mit der Probenoberfläche großflächig eine physikalische und chemische Veränderung der Probe einhergeht.

Für eine optimale Ablation muss die Schwellenenergie der Ablation eindeutig überschritten werden, ohne ein großes Plasma entstehen zu lassen.

Die hierzu einzustellende Energiedichte sollte, da sie linear mit der ablierten Masse verknüpft ist, konstant gehalten werden.

Gerätebedingt kommt es beim Laser-Ablationssystem LAS UP213 FB (New Wave Research, Inc., Fremont, CA, USA) zu einer nicht vom Hersteller korrigierten Drift der emittierten Energie bei gleichbleibend eingestellten Laser Parametern.

Wie in Abb. 56 zu sehen, steigt die Energiedichte zu Anfang stark an, fängt jedoch schon nach wenigen Sekunden an zu fallen, um dann nach ungefähr einer Stunde einen Punkt zu erreichen, an dem nur noch eine minimale Drift stattfindet.



**Abb. 56: Beobachtete Energiedichtedrift des verwendeten Laser-Ablationssystems LAS UP 213 FB**

Die Quelle der Energiedichtedrift ist wahrscheinlich ein konstruktives Detail des Laser-Ablationssystems:

Der verwendete Laser ist kein nativer UV-Laser, der direkt Strahlung im UV-Bereich emittiert. Die eigentliche Laserquelle ist ein Nd:YAG-Laser der ausschließlich IR-Strahlung von 1064 nm produziert. Durch die Verwendung von optisch nicht linearen Linsenmaterialien (z.B.: Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) oder  $\beta$ -Bariumborat ( $\beta\text{-BaB}_2\text{O}_4$ )) wird eine Frequenzvervielfachung der ursprünglichen IR-Laserstrahlung erreicht<sup>[68,103]</sup>. Über die Verdoppelung (2. Harmonische, 532 nm) bzw. Verdreifachung (3. Harmonische, 355 nm) der Frequenz wird die fünfte Harmonische von 213 nm erzeugt. Die Effizienz der Frequenzvervielfachung durch optisch nicht lineare Materialien in den sog. Harmonischen Generatoren ist sehr stark von deren Temperatur abhängig<sup>[103]</sup>. Da beim verwendeten Laser-Ablationssystem die harmonischen Generatoren nicht durch eine Kühlung thermisch stabilisiert sind, kann die Drift der Energiedichte der 213 nm Strahlung auf eine Temperaturänderung der nicht linearen Materialien zurückgeführt werden.

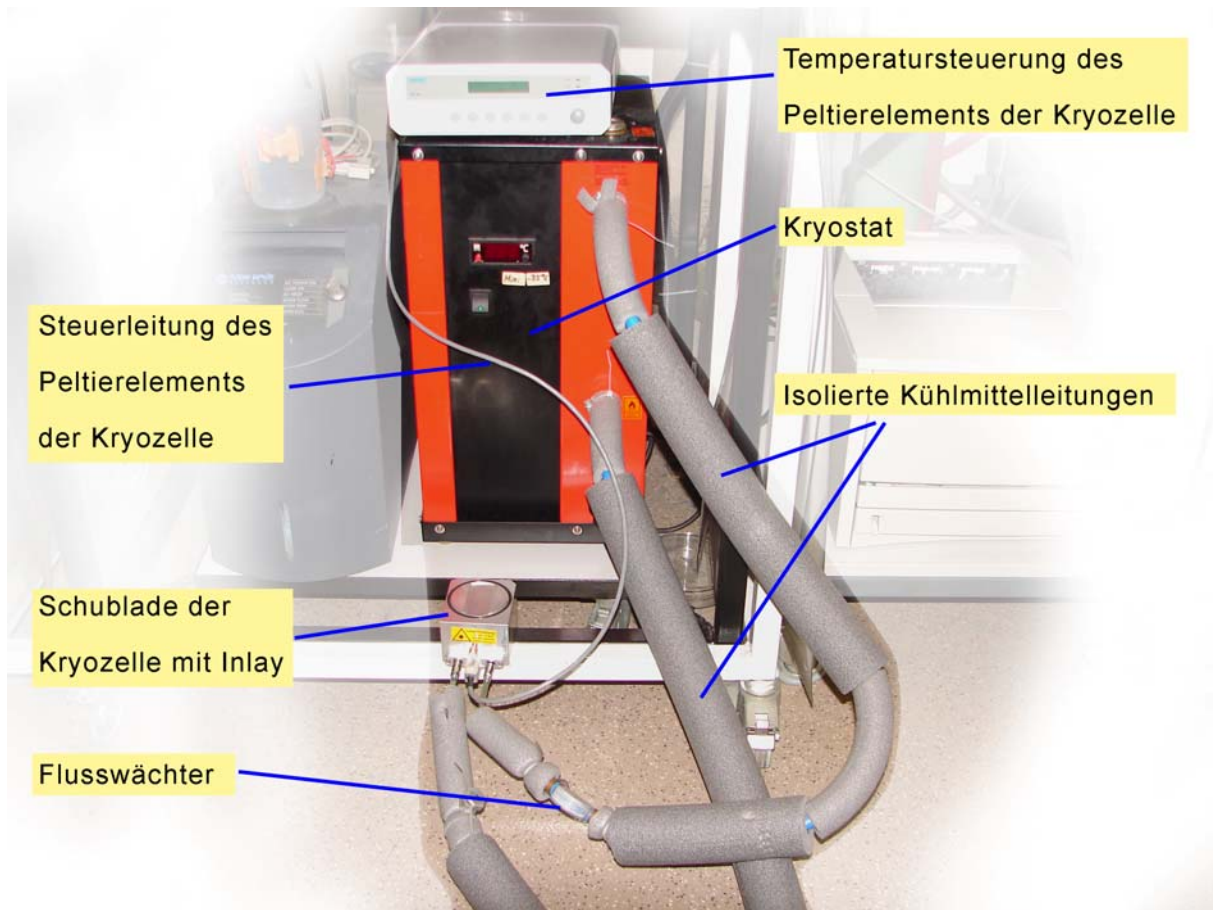
Als Folge dieser Drift ergibt sich, dass der Laser bei beabsichtigter Linienablation mindestens eine Stunde vorwärmen sollte und dass die Energiedichte von Zeit zu Zeit einer Nachregelung bedarf, da weiterhin eine leichte Drift stattfindet.

Es wird empfohlen von der Geräte- bzw. Steuerungssoftwareseite eine automatische Energiedichtesteuerung einzurichten, welche den als optimal ermittelten Wert nachregelt und so konstant hält. Zur Beseitigung der eigentlichen Quelle der Energiedichtedrift könnte eine Kühlung der harmonischen Generatoren etabliert werden. Diese ist jedoch kostenintensiv und wegen räumlicher Enge im Gehäuse nicht einfach zu installieren.

## **4.1.5 Das Kryozellensystem**

### **4.1.5.1 Aufbau des Kryozellensystems**

Zur Analyse von Gewebeproben und Polyacrylamid-Gelen aus der Gelelektrophorese in gefrorenem Zustand wird eine kühlbare Ablationskammer etabliert. Sie besteht aus einer Ablationskammerschublade, in der ein Peltierelement installiert ist, das sich über ein Steuermodul auf Temperaturen von ca. 30 °C bis – 30 °C einstellen lässt. Die Abwärme des Peltierelements wird über eine Wasserkühlung abgeführt (Abb. 57).



**Abb. 57: Kryozelle mit Kryostat und Temperatursteuerung**

Da sich bei längerem Betrieb der Kryozelle das mitgelieferte 5 L Wasserdepot (Abb. 58) zunehmend erwärmt, wird es durch einen Kryostaten ersetzt, der das Kühlwasser kontinuierlich auf einer eingestellten Temperatur von 5 °C hält, was für den allgemeinen Betrieb der Kryozelle ausreicht und einer Vereisung des Kühlwassers vorbeugt.



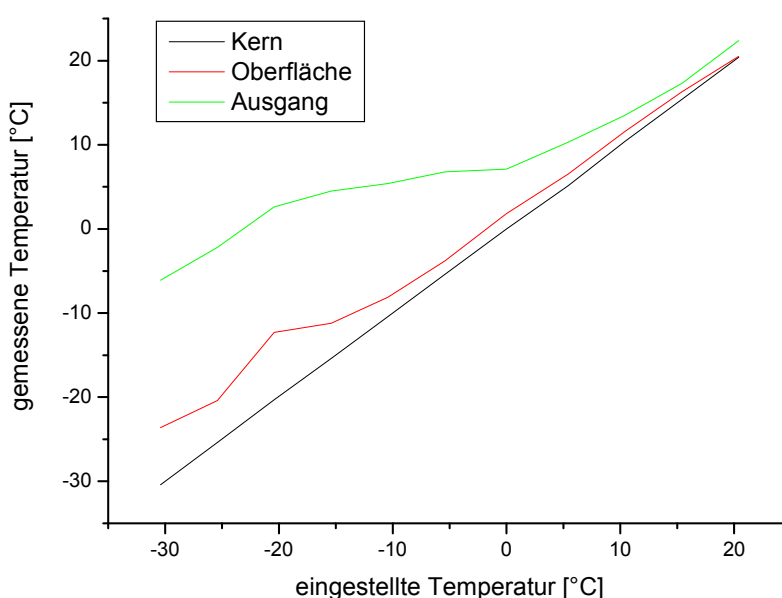
**Abb. 58: Altes 5L-Wasserreservoir der LA-ICP-MS von New Wave Technologies (Eheim Aquarienpumpe)**

Die Verwendung eines Ethanol/Wassergemisches als Kühlmedium zur Erreichung niedrigerer Temperaturen schon im Vorlauf ist möglich, führt jedoch zu einem stark erhöhten Hintergrund auf  $m/z$  13 ( $^{13}\text{C}$ ). Zurückzuführen ist dies auf eine starke Diffusion des Ethanols durch den Vinylschlauch in der Zuleitung direkt unter dem Peltierelement in der Ablationskammer. Ein Wechsel des Materials des Schlauches sollte das Problem beheben. Da Wasser jedoch für die hiesigen Anwendungen als Kühlmittel vollkommen ausreicht, wird auf einen Tausch verzichtet.

#### 4.1.5.2 Temperaturen im Inneren der Kryozelle

Die Temperatursteuerung der Ablationskammer basiert auf einem im Peltierelement integrierten Temperatursensor, der die sog. Kerntemperatur anzeigt. Diese unterscheidet sich allerdings von der Oberflächentemperatur einer Probe auf Grund deren Erwärmung durch das strömende Ablationsgas.

Um die Temperaturbedingungen zu untersuchen, die während einer Analyse in der Kryoablationskammer herrschen, wird mittels eines Thermoelements die Probenoberflächentemperatur sowie die Temperatur des Trägergases am Zellausgang gemessen (Abb. 59).



**Abb. 59:** Vergleich der programmierten und tatsächlichen Temperaturen im Kern, an der Probenoberfläche und am Zellausgang (Aerosol) (genaue Werte siehe Tabelle 51, S.214 im Anhang)

Die programmierte Temperatur stimmt bei allen Temperaturen zwischen -30 und 20 °C bis auf 0,1 °C nach einer Stabilisierungsphase von 10 Minuten mit der erreichten Kerntemperatur überein. Die Temperatur auf der Probenoberfläche (Objektträger) ist stets um wenige Grad gegenüber der Kerntemperatur erhöht. Die Temperaturdifferenz steigt allerdings je tiefer die Kerntemperatur ist, da das Trägergas an der Zelleinlassdüse stets Raumtemperatur beibehält. Sie beträgt jedoch bei der tiefsten eingestellten Temperatur von -30 °C lediglich 6 °C. Das Trägergas kühlt sich während seines Aufenthalts in der Ablationskammer zwar ab, bleibt aber bis zu Kerntemperaturen von ca. -20 °C noch über 0 °C. Es wird also empfohlen, bei tiefen Temperaturen zwischen -25 und -30 °C zu arbeiten, um die Verdunstungs- und Eintrocknungsgefahr der Probe zu minimieren. Auch sollte die Probe nicht länger als nötig in der Ablationskammer verbleiben.

Ebenfalls sollte die Verwendung des „Ring“-Beleuchtungsmodus bedacht werden, da dieser die komplette Kryozelle ausleuchtet und bei einer maximalen Intensität eine Temperaturerhöhung von 0,5 °C auf der Probenoberfläche bewirken kann. Als Alternative bietet sich hier der zweite Beleuchtungsmodus an, der nur die Fläche der Probe beleuchtet, die sich im Fokus des Lasers befindet.

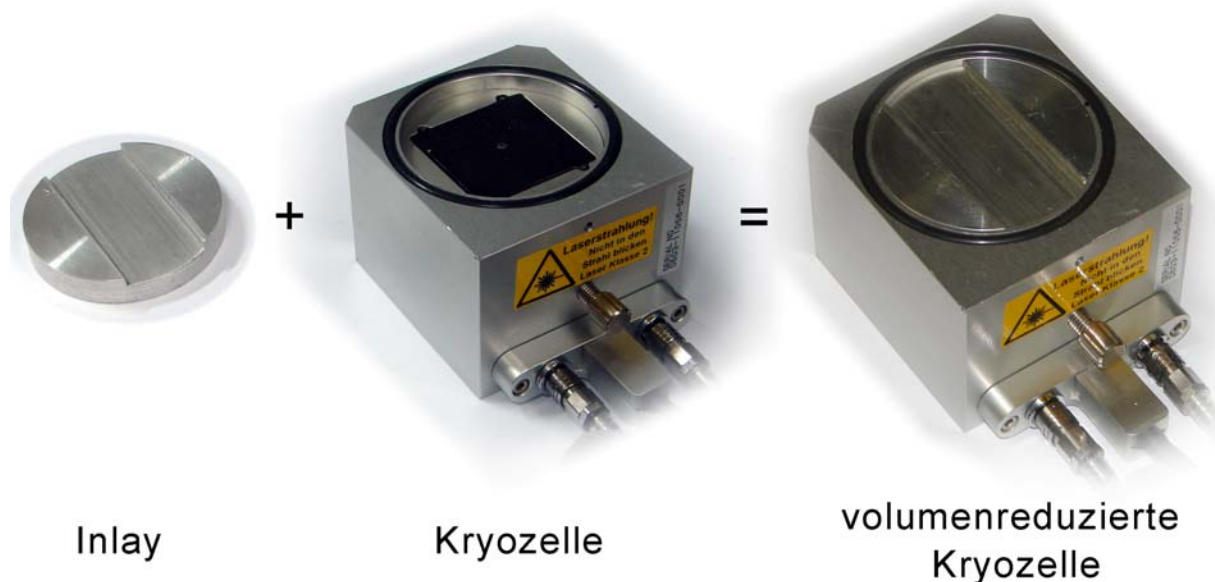
Es hat sich gezeigt, dass bei tiefen Temperaturen (< -20 °C) das Lasereintrittsfenster der Kryoblationskammer langsam von außen durch sich niederschlagende Luftfeuchtigkeit beschlägt. Um diesen Effekt zu verhindern, wurde der Kopfbereich über dem Ablationskammerfenster mit einer Argonspülung versehen, die beim Betrieb der Kryozelle die feuchte Luft durch trockenes Argon ersetzt.

Eine weitere Verbesserung des Kryozellensystems ließe sich durch eine Isolation der Kryozelle, eine Temperatursteuerung des Kryozellengehäuses insgesamt sowie durch eine Kühlung des Ablationsgases auf die eingestellte Temperatur erzielen. Die Gefahr der Austrocknung der Probenmatrix und somit deren Veränderung wäre gebannt und eine Probe könnte beliebig lange in der Ablationskammer ähnlich wie in einem Gefrierschrank gelagert werden.



#### 4.1.5.3 Verringerung des Kryozellvolumens

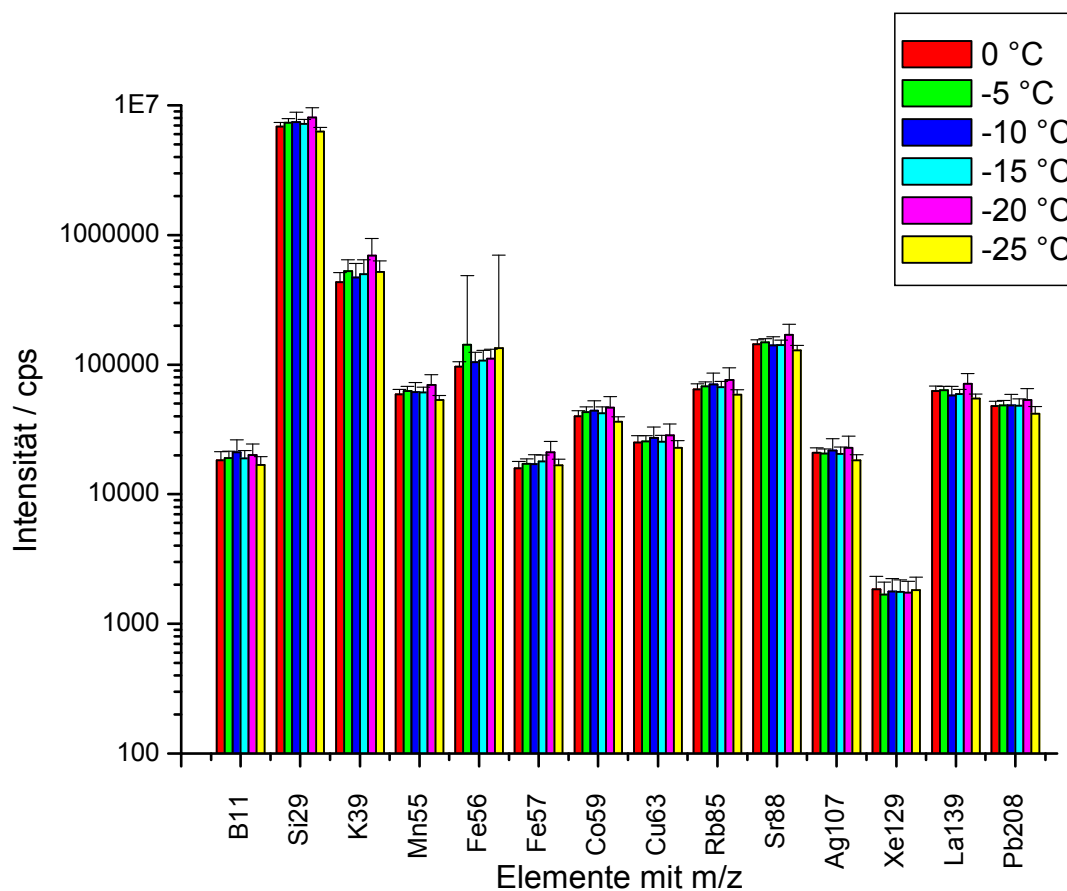
Eine weitere Optimierung der Kryozelle wird im Hinblick auf das Ablationskammervolumen erreicht. Es ist ein Inlay entwickelt worden, welches das effektive Ablationskammervolumen auf den gleichen Wert (27,5 ml) reduziert wie es bei der nicht gekühlten Ablationskammer der Fall ist. Da es sich nach dem Einsetzen des Inlays auch um dieselbe Kammergeometrie wie beim optimierten, nicht gekühlten Zelldesign handelt, kann auf eine Untersuchung des Auswaschverhaltens unter Verweis auf das bereits untersuchte Verhalten (Kapitel 4.1.3.1.2, S. 91) verzichtet werden.



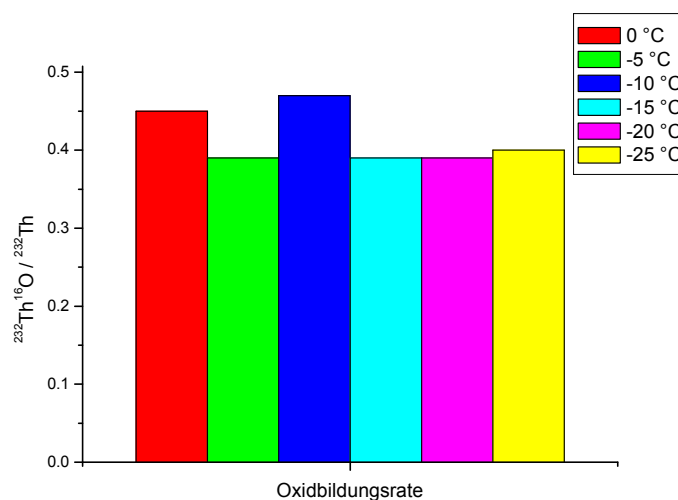
**Abb. 60:** Zusammensetzung der volumenreduzierten Kryoablationskammer aus Inlay und Kryozelle

#### 4.1.5.4 Temperaturabhängigkeit der Ablation

Um den Einfluss der Proben temperatur auf die Ablation zu untersuchen, wurde in der Kryoablationskammer das Standardreferenzmaterial NIST 612 „Trace Elements in Glass“ auf bestimmte Temperaturen zwischen 0 und -25 °C eingestellt und anschließend an ausgewählten Elementen über den ganzen Massenbereich des Periodensystems der Elemente (PSE) bei gleichen Laser-Ablationsparametern analysiert.



**Abb. 61:** LA-ICP-MS-Intensitäten über das ganze PSE bei unterschiedlichen Probertemperaturen und ansonsten konstanten Analysenbedingungen



**Abb. 62:** LA-ICP-MS Messung der Oxidbildungsrate (m/z 248 / m/z 232) bei unterschiedlichen Probertemperaturen und ansonsten konstanten Analysenbedingungen

Wie an den Ergebnissen aus Abb. 61 und Abb. 62 (genaue Messwerte in Tabelle 51, S. 214 im Anhang) zu sehen ist, gibt es keine signifikanten Änderungen der Intensitäten sowie der Oxidbildungsrate im Arbeitsbereich der Kryoablationskammer zu beobachten. Dies lässt sich damit begründen, dass die Temperaturen, die kurzzeitig bei der Ablation auftreten (1000 bis über 20000 K<sup>[50]</sup>), um mehrere Größenordnungen größer sind als die verhältnismäßig geringe Änderung der Ausgangstemperatur in der Kammer.

Da die Proben temperatur im untersuchten Temperaturbereich unabhängig vom Analysenresultat ist, kann die Temperierung rein nach den idealen Lagerungs- und Handhabungsbedingungen der Probe geschehen.

## **4.2      *Ortsaufgelöste Elementkonzentrationsbestimmung an Gewebeschnitten***

### **4.2.1      Entwicklung der matrixangepassten Standardadditionskalibration anhand der Modellmatrix Schweineleber**

Bei stark matrixabhängigen Analyseverfahren wie der LA-ICP-MS ist das Verfahren der Standardaddition der gängige Ansatz um Kalibrationsprobleme zu lösen.

Zur Entwicklung eines Quantifizierungsverfahrens für Gewebeschnitte wird die Schweineleber als Modellmatrix gewählt. Sie ist leicht in größeren Mengen verfügbar, preiswert und weist abgesehen von der Mikroanatomie einen homogenen Charakter auf.

Vor der Anwendung des Standardadditionsverfahrens sowie zur internen Überprüfung wird zunächst die Modellmatrix so weit wie möglich charakterisiert. Anschließend wird die Herstellung der Kalibrationsproben beschrieben und deren Ansatz kontrolliert. Nach der Messung dieser Proben wird anhand der erhaltenen Daten die eigentliche Kalibration der LA-ICP-MS durchgeführt und die Elementbestimmung in der Probe per LA-ICP-MS durchgeführt. Zuletzt werden die Ergebnisse mit den aus dem Aufschluss Bestimmten verglichen.

#### **4.2.1.1      Charakterisierung der Matrix**

Um die Matrix (Schweineleber) in ihrer Gesamtheit möglichst gut zu beschreiben, wird sie einer Reihe von Analyseverfahren unterworfen. Es wird der Wassergehalt mittels Trocknung bestimmt und anschließend der Glühverlust um den anorganischen Anteil in Gänze zu erfassen. Vom getrockneten Teil der Matrix wird eine CHNSO-Elementaranalyse angefertigt sowie eine Gesamtmetallbestimmung mittels Mikrowellendruckaufschluss und anschließender Analyse mittels ICP-MS. Auf diese Weise lässt sich die gesamte Matrix bis in den Ultraspurenbereich aufschlüsseln und stellt wichtige Informationen zur Entwicklung der Standardadditionsmethode und ihrer internen Überprüfung zur Verfügung.

#### 4.2.1.1.1 Wassergehaltsbestimmung

Wie allgemein bekannt ist, bestehen biologische Gewebe zu großen Teilen aus Wasser. Um die hier untersuchte biologische Matrix (Schweineleber) näher zu charakterisieren, wird in einem ersten Schritt ihr Wassergehalt untersucht. Hierzu wird auf das Verfahren der Wassergehaltsbestimmung durch Trocknung nach DIN EN 12880:2000 zurückgegriffen. Dieses Verfahren sieht die Trocknung der Proben bis zur Gewichtskonstanz bei 105 °C von jeweils soviel Probensubstanz vor, dass mindestens 0,5 g Trockenrückstand übrig bleiben. Um eine homogene Probe zu erreichen, wird das Schweinelebergewebe zunächst grob vorzerkleinert und anschließend kryogemahlen.

**Tabelle 22: Wassergehaltsbestimmung von Schweineleber**

<b>Einwaage Leber</b>	<b>Trocken- masse</b>	<b>Differenz</b>	<b>Wasser- gehalt</b>	<b>Mittelwert Wassergehalt</b>	<b>Standard- abweichung</b>
[g]	[g]	[g]	[%]	[%]	[%]
4,2319	1,1331	3,0989	73,23	<b>72,65</b>	<b>±0,38</b>
6,5558	1,8020	4,7538	72,51		
5,4802	1,5093	3,9709	72,46		
6,8428	1,8876	4,9552	72,41		

Die Bestimmung des Wassergehalts liefert einen Anteil von  $72,65 \pm 0,38$  % Wasser in Schweineleber (Tabelle 22). Dieser kann auch in etwa durch die Methode der Gefriertrocknung bestätigt werden, die einen Wasseranteil von 71,26% findet. Der geringfügige Unterschied der beiden Werte kommt möglicherweise durch chemisch gebundenes Wasser (wie z.B. Hydrathüllenwasser) zu Stande, das mittels Gefriertrocknung nicht entfernt werden kann.

Beide Werte stimmen mit dem aus der Literatur bekannten Bereich des Wassergehalts von Schweineleber von  $72 \pm 1\%$  überein<sup>[154]</sup>.

#### 4.2.1.1.2 Glühverlustbestimmung

Zur weiteren Untersuchung der Matrix wird die Glühverlustbestimmung herangezogen. Sie lässt Rückschlüsse auf den sich nicht verflüchtigenden Anteil der Matrix, den sogenannten Glührest zu.

Hierzu werden die getrockneten Proben aus der Wassergehaltsbestimmung direkt nach dem Auswiegen für 8 Stunden in den Muffelofen gestellt und auf 550 °C erhitzt. Hierbei zersetzt sich der organische Anteil der Matrix und nur der mineralische Rest bleibt erhalten.

Tabelle 23: Bestimmung des Glührests von getrockneter Leber

Einwaage getrocknete Schweineleber [g]	Masse Glührest [g]	Anteil Glührest [%]	Mittelwert Rest [%]	Standard- abweichung [%]	Relative Standard- abweichung
1,1854	0,0623	5,26	5,25	±0,097	±1,85 %
1,8627	0,0962	5,16			
1,5642	0,0813	5,20			
1,9601	0,1056	5,38			

Wie aus Tabelle 23 zu sehen, liegt der mittlere Glührest des Trockenanteils bei ca.  $5,25 \pm 0,097$  %. Übertragen auf die Gesamtmasse (inklusive dem Wasseranteil) liegt er bei ca.  $1,44 \pm 0,03$  %. Dieser Wert stimmt mit dem aus der Literatur bekannten Gesamtmineraliengehalt für Schweineleber von 1,4% überein<sup>[155]</sup> und liegt knapp unterhalb des Wertes für allgemeines Säugergewebe von ca. 2%<sup>[158]</sup>.

#### 4.2.1.1.3 CHNSO-Bestimmung von getrockneter Schweineleber

Um die Hauptelemente der Modellmatrix Schweineleber zu bestimmen, wird eine CHNSO-Analyse der getrockneten und gemahlenen Leber durchgeführt. Die Messungen hierzu wurden von Frau Hiltenkamp und Frau Brauner vom Institut für Anorganische Chemie durchgeführt.

**Tabelle 24: Analysenergebnis der Elementaranalyse von getrockneter Schweineleber**

<b>Massenanteil</b>	<b>C-Gehalt</b>	<b>H-Gehalt</b>	<b>N-Gehalt</b>	<b>O-Gehalt</b>	<b>S-Gehalt</b>
Gefriergetrocknete Schweineleber	48,78 %	6,975 %	10,53 %	23,54 %	0,65 %

Rechnet man die Werte aus der obigen Tabelle unter Einbeziehung des Wassergehalts auf das unbehandelte Lebergewebe um, so erhält man die folgende CHNSO-Zusammensetzung der Leber:

**Tabelle 25: CHNSO-Zusammensetzung von unbehandelter Schweineleber**

<b>Massenanteil</b>	<b>C-Gehalt</b>	<b>H-Gehalt</b>	<b>N-Gehalt</b>	<b>O-Gehalt</b>	<b>S-Gehalt</b>
unbehandelte Schweineleber	13,34%	9,98%	2,88%	71,02%	0,18%

Der Sauerstoffgehalt macht auf Grund des großen Wasseranteils und der verhältnismäßig großen molaren Masse deutlich den größten Massenanteil aus. Zusammen mit den anderen Haupt- und Nebenbestandteilen, die ebenfalls alle zur Gruppe der strukturaufbauenden Elemente gehören, lassen sich 97,4 % der Gesamtmasse in diesen 5 Elementen wiederfinden. Alle weiteren Bestandteile sind also nur im Spurenbereich enthalten und tragen somit nicht zum direkten Aufbau der Matrix bei.

#### **4.2.1.1.4 Gesamtmetallbestimmung des Lebergewebes**

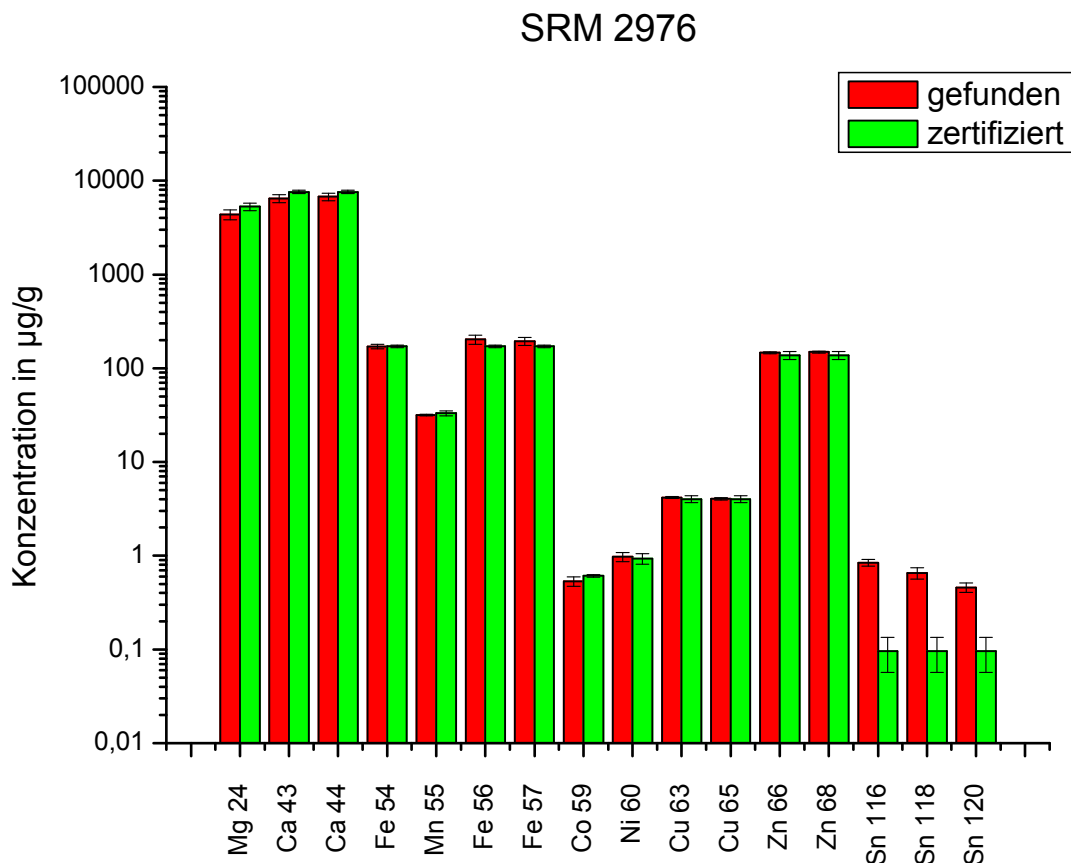
Zum Abschluss der Matrixcharakterisierung wird eine Bestimmung der Spuren- und Ultrapurenelemente durchgeführt. Hierzu wird das homogenisierte, gefriergetrocknete und gemahlene Pulver der Schweineleber mittels oxidativem Mikrowellendruckaufschluss aufgeschlossen und die erhaltenen Lösungen mittels ICP-MS auf ihren Elementgehalt analysiert. Zur Kontrolle des Verfahrens wird parallel ebenfalls das Standardreferenzmaterial SRM 2976 „Mussel Tissue (Trace Elements and Methylmercury)“<sup>[152]</sup> analysiert.

**Tabelle 26: Mittels ICP-MS bestimmte Elementkonzentrationen in der Schweineleber**

<b>Schweineleber Element</b>	<b>Konzentration in µg/g</b>	<b>SD in µg/g</b>	<b>RSD</b>	<b>Konzentration in der Literatur in µg/g</b>
Mg	158,514	2,2197	1,4%	230 <sup>[155]</sup>
Ca	49,006	5,4585	11,1%	70 <sup>[155]</sup>
Mn	2,140	0,0493	2,3%	3,0 ± 0,52 <sup>[156]</sup>
Fe	99,012	1,9839	2,0%	180 <sup>[155]</sup>
Co	0,011	0,0002	1,7%	0,010 ± 0,004 <sup>[156]</sup>
Ni	0,056	0,0042	7,4%	0,011 ± 0,028 <sup>[156]</sup>
Cu	9,049	0,1705	1,9%	9 ± 4 <sup>[156]</sup>
Zn	59,378	0,6498	1,1%	74 ± 27 <sup>[156]</sup>
Sn	0,254	0,0577	22,7%	

Der Vergleich der gefundenen Konzentrationen mit den Literaturwerten zeigt deutlich, dass die gefundenen Werte den natürlichen Konzentrationsbereichen nicht kontaminierter Schweineleber entsprechen. Die teilweise großen Schwankungsbereiche können auf natürliche Individualunterschiede der untersuchten Tiere sowie eventuell unterschiedliche Haltungsbedingungen zurückgeführt werden, da den zitierten Quellen Untersuchungen in verschiedenen Ländern zu Grunde liegen.





**Abb. 63:    Aufschluss des Standardreferenzmaterials SRM 2976<sup>[152]</sup>: Vergleich der gefundenen Konzentrationen mit den zertifizierten Werten**

Der Vergleich der zertifizierten Konzentrationswerte des Standardreferenzmaterials SRM 2976 mit den durch die ICP-MS bestimmten zeigt bei allen Elementen außer Zinn eine gute Übereinstimmung (Abb. 63; Werte in Tabelle 52, S. 215 im Anhang). Die Ergebnisse des Aufschlusses können also als valide betrachtet werden.

Die gefundenen Konzentrationen an Zinn sind deutlich gegenüber den zertifizierten Werten erhöht. Erklärt werden kann der Mehrbefund durch eine mögliche Kontamination der verwendeten Polyethylen-Probengefäße mit Zinn, da oft zinnhaltige Ziegler-Natta-Katalysatoren zu deren Herstellung verwendet werden und eine Auslaugung des Zinns durch die saure Probenlösung stattfindet.

#### **4.2.1.2 Kalibration mittels Standardadditionsproben**

Um eine Kalibration der LA-ICP-MS mittels Standardaddition für die Untersuchung der Modellmatrix Schweineleber zu erreichen, wird der Matrix zunächst das Wasser entzogen. Anschließend wird die getrocknete Leber zur Homogenisierung gemahlen und das entfernte Volumen an Wasser durch Standardlösungen wiederaufgefüllt. Die Proben werden schockgefroren und hieraus Gewebeschnitte hergestellt, die dieselbe Schnittdicke aufweisen wie die zu untersuchenden Proben.

##### ***4.2.1.2.1 Ansatz der Multielementstammlösung zum Ansatz der Standardadditionsproben***

Vor dem Ansatz der Standardadditionsproben müssen die Spikelösungen angesetzt werden, mit denen der entfernte Wassergehalt ersetzt werden soll. Wie schon aus der Literatur<sup>[154-156]</sup> bekannt weisen einige Elemente in der Leber sehr hohe Konzentrationen ( $>100 \mu\text{g/g}$ ) auf. Da die zugespikten Elementkonzentrationen in den Standardadditionsproben für eine sinnvolle Kalibration über die Konzentrationen im Gewebe hinausgehen müssen und keine genügend hoch konzentrierten Elementstandardlösungen verfügbar sind, wird eine Multielementstammlösung zum Teil aus Feststoffen angesetzt. Hierbei wurde darauf geachtet, keine Sulfate oder Halogenide zu benutzen, um die Verunreinigung des ICP-MS bei der Analyse zu vermeiden. Die verwendeten Substanzen für ein Element und die Zielkonzentration der Stammlösung sind in Tabelle 27 aufgeführt.

**Tabelle 27: Elemente der Spikestammlösung mit der jeweiligen Ursubstanz und Zielkonzentration**

Element	Ursubstanz oder Standardlösung	Zielkonzentration in µg/g
Mg	MgCO <sub>3</sub>	20000
Ca	CaCO <sub>3</sub>	5000
Mn	MnCO <sub>3</sub>	200
Fe	Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	13000
Co	1000 µg/ml Co-Standardlösung	0,4
Ni	1000 µg/ml Ni-Standardlösung	0,2
Cu	CuO	1400
Zn	Zn (s)	5000
Sn	1000 µg/ml Sn-Standardlösung	2

#### **4.2.1.2.2 Qualifizierung der Multielementstammlösung**

Die Substanzen, die zum Ansatz der Multielementstammlösung verwendet werden, sind teilweise schon älteren Datums, so dass Kontaminationen und Einziehen von Feuchtigkeit im Laufe der Zeit nicht ausgeschlossen werden können. Auch liegt die angegebene Reinheit meist nur bei 99%.

Um die tatsächlich angesetzten Konzentrationen zu bestimmen und die Multielementstammlösung damit zu qualifizieren, wird diese um den Faktor 1000 verdünnt und mittels der kalibrierten ICP-MS gemessen.

Die folgenden Konzentrationen (Tabelle 28) werden gegenüber den Theoriewerten aus den Einwaagen mittels ICP-MS gefunden:

**Tabelle 28: Vergleich der theoretisch angesetzten (eingewogenen) mit den tatsächlich gefundenen Konzentrationen der Multielementstammlösung zur Standardadditionskalibration**

Element	Theoriewert in µg/mL	Analysenwert in µg/mL	RSD	Blank in µg/mL	Wiederfindung
Mg24	19116	16633	0,7%	1,496	87,0%
Ca43	4770	4385	1,3%	3,330	91,9%
Ca44	4770	4619	1,2%	5,696	96,9%
Fe54	12857	11909	0,6%	8,546	92,6%
Mn55	191,49	165,79	0,7%	0,053	86,6%
Fe56	12857	11969	0,9%	29,928	93,1%
Fe57	12857	11258	1,1%	5,146	87,6%
Co59	0,383	0,566	0,6%	0,002	147,9%
Ni60	0,191	4,702	1,3%	0,022	2455,7%
Cu63	1339	1295	0,9%	0,092	96,7%
Cu65	1339	1282	0,7%	0,069	95,8%
Zn66	5062	7141	0,6%	0,167	141,1%
Zn68	5062	7107	0,8%	0,190	140,4%
Sn118	1,915	2,266	2,5%	0,121	118,4%

Die gemessenen Konzentrationen finden meist über 95 % der angesetzten Konzentration wieder. Der Unterschied liegt in der mangelnden Reinheit der Substanzen sowie deren Hygroskopie begründet, da die Gefäße meist schon viele Jahre angebrochen sind und Feuchtigkeit einziehen konnte. Bei den Elementen Cobalt, Nickel, Zink und Zinn ist zu beobachten, dass eine Kontamination durch irgendeine der verwendeten Ursubstanzen vorliegt. Sie mündet in einer teils sehr deutlichen Erhöhung der Wiederfindungsrate.

Die Kontaminationen bei Cobalt, Zink und Zinn haben jedoch keinen Einfluss auf das weitere Vorgehen, da die qualifizierte Konzentration immer noch nahe genug an der gewünschten ist. Die Konzentration an Nickel liegt jedoch über eine Größenordnung über der Zielkonzentration, so dass es möglich ist, dass der Kalibrationsbereich durch die Kontamination zu hoch angesetzt ist.

#### **4.2.1.2.3 Ansatz der Standardadditionskalibrationsproben**

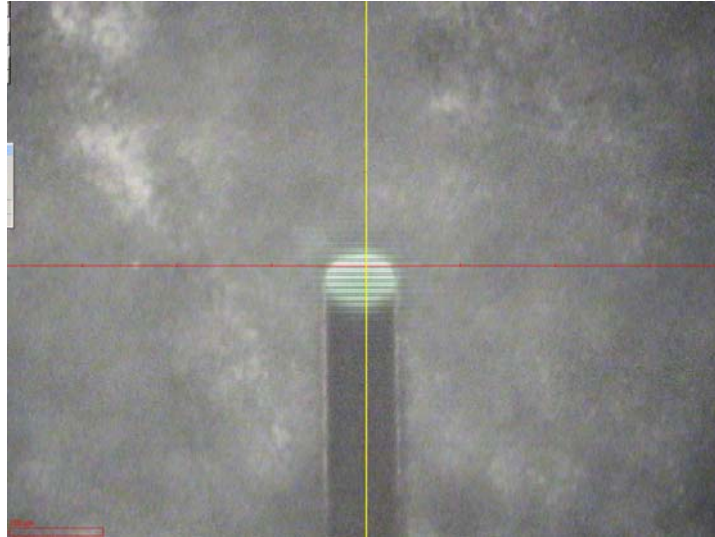
Zur Herstellung der Standardadditionskalibrationsproben wird zunächst die pürierte Leber gefriergetrocknet und anschließend die trockene Leber in der Planetenkugelmühle fein gemahlen. Die Mühle sorgt gleichzeitig auch für eine gute Homogenisierung der Elementkonzentrationen in der Probe.

Die Kalibrationsproben werden angesetzt, indem das entfernte Volumen an Wasser durch ein äquivalentes Volumen jeweils verschiedener Verdünnungen der Stammlösung (relative Verdünnungen zur Stammlösung: 1:9; 1:19; 1:39) ersetzt (zusätzlich eines Blanks mit verdünnter Salpetersäure). Nach Homogenisierung mittels Rühren und Ultraschallbad wird der Gewebebrei in gereinigte Kryomolds gefüllt und mittels eines auf -195°C gekühlten, selbstentwickelten Alublocks (siehe Abb. 34, S. 72) schockgefroren.

Diese gefrorenen Kalibrationsproben werden anschließend mittels Kryomikrotom geschnitten, wobei die Schnittdicke dem zu untersuchenden Gewebeschnitt angepasst wird.

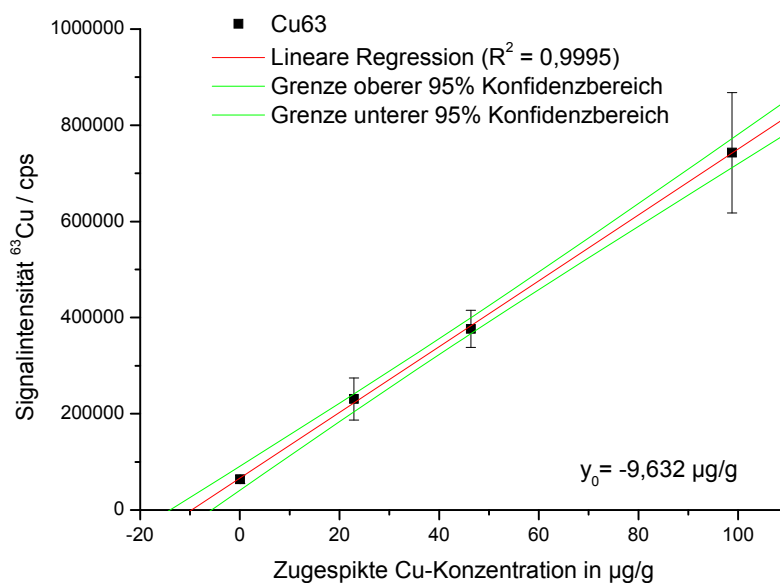
#### **4.2.1.2.4 Kalibration der LA-ICP-MS mittels Standardaddition zur Bestimmung von Elementkonzentrationen in Schweineleber**

Zur Quantifizierung von Elementkonzentrationen in der Matrix Schweineleber wird die LA-ICP-MS mittels des Standardadditionsverfahrens kalibriert. Hierzu werden die angespikten Schnitte der Kalibrationsproben zusätzlich eines Blanks durch Linienscans der LA-ICP-MS analysiert und zwar mit denselben Laser- und ICP-MS-Parametern wie sie zur Analyse des Gewebeschnittes verwandt werden.



**Abb. 64:** Screenshot eines Linienscans des Laser-Ablations-Systems während der Analyse eines Schweineleberschnittes

Die erhaltenen Signalintensitäten werden gegen die jeweils zugespikte Elementkonzentration aufgetragen. Mittels linearer Regression lässt sich die Kalibrationsgerade erstellen, deren Schnittpunkt mit der x-Achse formell eine negative zugespikte Konzentration darstellt. Ihr Betrag entspricht der Elementkonzentration im Blank bzw. der mittleren Elementkonzentration in der zu untersuchenden Probe.



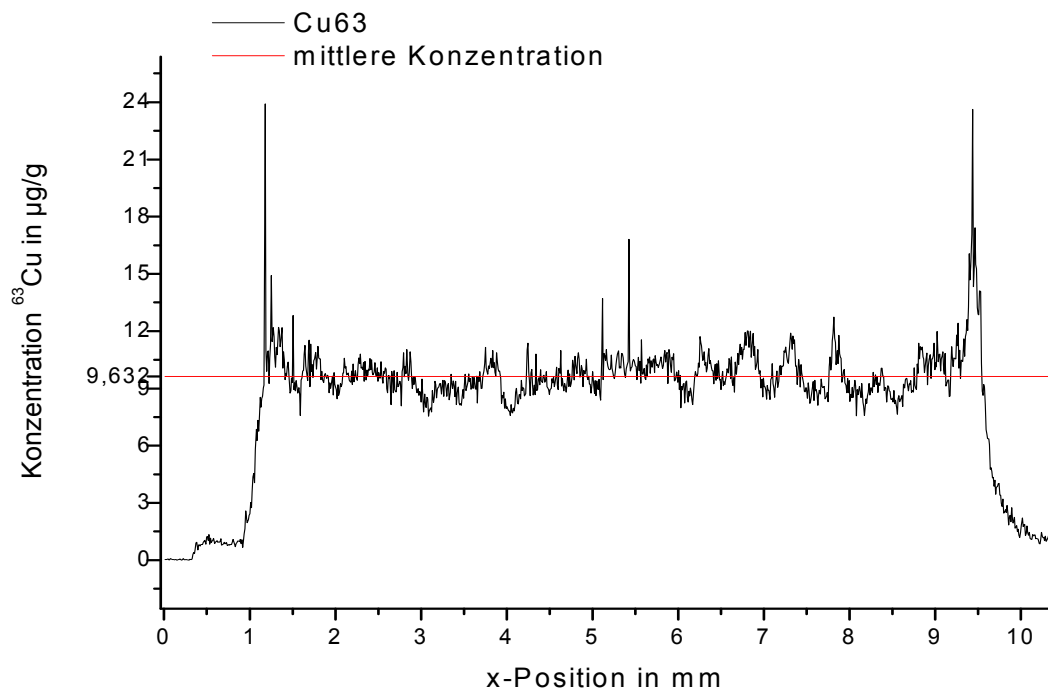
**Abb. 65:** Kalibrationsgerade der LA-ICP-MS zur Bestimmung von Kupfer (<sup>63</sup>Cu) in Schweineleber mittels Standardaddition

Vergleicht man die mittels Standardaddition und LA-ICP-MS bestimmten Elementkonzentrationen von Schweineleber mit denen aus dem oxidativem Mikrowellendruckaufschluss Bestimmten, so liegen die Werte in guter Übereinstimmung und der 95%ige Vertrauensbereich trifft in allen Fällen die Aufschlusskonzentration. Für die übrigen analysierten Elemente wie Calcium ( $^{43}\text{Ca}$ ), Cobalt ( $^{59}\text{Co}$ ), Nickel ( $^{60}\text{Ni}$ ) und Zinn ( $^{118}\text{Sn}$ ) sind die Signalintensitäten zu gering, um eine sinnvolle Kalibration erreichen zu können.

**Tabelle 29: Vergleich der gefundenen Elementkonzentrationen in Schweineleber aus dem Aufschluss mit den Ergebnissen der mittels Standardaddition kalibrierten LA-ICP-MS**

	Konzentration aus Aufschluss			Konzentration bestimmt mittels LA-ICP-MS			Wiederfindungsrate
	Konzentration in $\mu\text{g/g}$	SD in $\mu\text{g/g}$	RSD	Konzentration in $\mu\text{g/g}$	95%iger Vertrauensbereich	RSD	
$^{24}\text{Mg}$	158,514	2,220	1,4%	171,674	$\pm 36,799$	21,4%	108,3%
$^{55}\text{Mn}$	2,140	0,049	2,3%	2,219	$\pm 0,373$	16,8%	103,7%
$^{56}\text{Fe}$	107,925	4,666	4,3%	91,247	$\pm 18,274$	20,0%	84,5%
$^{57}\text{Fe}$	99,012	1,984	2,0%	115,080	$\pm 42,646$	37,1%	116,2%
$^{63}\text{Cu}$	9,049	0,170	1,9%	9,632	$\pm 4,148$	43,1%	106,4%
$^{66}\text{Zn}$	59,378	0,650	1,1%	81,724	$\pm 22,303$	27,3%	137,6%

Die mittels Standardaddition bestimmten mittleren Konzentrationen in den Standardadditionsproben werden im letzten Schritt der Kalibration nun mit den mittleren Elementintensitäten der Signale der orts aufgelösten Analysen korreliert, so dass die Signalintensitäten in Konzentrationen überführt werden.



**Abb. 66:** Ortsaufgelöste Kupferkonzentrationsverteilung aus einem Linienscan der LA-ICP-MS nach Kalibration mittels Standardaddition (rot: mittlere Intensität entspricht mittlerer gefundener Konzentration)

Zur Bestimmung der Nachweisgrenzen der Standardadditionsmethode werden die Standardabweichungen der nichtgespikten Probe anstelle der sonst üblichen Blindprobe herangezogen, da bei der Standardaddition keine Blindwerte bestimmt werden können<sup>[159]</sup>. Die Nachweisgrenzen werden errechnet, indem für jedes kalibrierte Isotop die dreifache Standardabweichung des Elementsignals der nichtgespikten Probe durch die jeweilige Kalibrationsgeradensteigung geteilt wird. Sie ergeben sich wie folgt (Tabelle 30):



**Tabelle 30: Nachweisgrenzen des Standardadditionsverfahrens für die Bestimmung von Elementkonzentrationen in Schweineleber**

Isotop	Nachweisgrenzen der Standardaddition in µg/g
<sup>24</sup> Mg	98,485
<sup>55</sup> Mn	1,041
<sup>56</sup> Fe	59,268
<sup>57</sup> Fe	62,618
<sup>63</sup> Cu	3,773
<sup>66</sup> Zn	20,802

Die Nachweisgrenzen des Standardadditionsverfahrens liegen deutlich über dem normalerweise veröffentlichten Bereich der Nachweisgrenzen der LA-ICP-MS<sup>[103]</sup>. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass die Nachweisgrenzen des Standardadditionsverfahrens immer stark von der Konzentration in der Bezugsprobe abhängen und es im Fall der Matrix Schweineleber nicht möglich ist, eine Blankprobe zu erhalten, die einerseits die Matrix enthält, jedoch andererseits nicht die natürlich enthaltenen Spurenelemente.

#### **4.2.2 Entwicklung einer synthetischen Matrix zur matrixangepassten, externen Kalibration der LA-ICP-MS zur Bestimmung von Elementkonzentrationen in Gewebeschnitten**

##### **4.2.2.1 Gründe für die Entwicklung einer an die Probenmatrix angepassten synthetischen Matrix**

Die Verwendung der Gewebematrix zur matrixangepassten Kalibration mittels Standardaddition kann nicht in jedem Fall angewandt werden, da es vorkommt, dass die Matrix in geringerer Menge vorliegt, als sie für die Herstellung von Standardadditionsproben notwendig ist (Beispiel: Matrix Cortex einer Maus). Weiterhin ist die Anwendung der Standardadditionsstrategie zur Kalibration der LA-ICP-MS für die Gewebeuntersuchung mit einem großen Aufwand an Probenvorbereitung (Mahlen zur Homogenisierung, Feuchtigkeitsgehaltsbestimmung, usw.) verbunden, was wiederum ein erhöhtes Kontaminationsrisiko in sich birgt.

Durch diese Nachteile motiviert, ergibt sich der Gedanke, die Matrix auf einem Weg durch die Entwicklung einer synthetischen Matrix nachzuahmen und zusätzlich die Nachteile der Standardadditionsmethode soweit wie möglich zu umgehen.

#### 4.2.2.2 Polyacrylamid als nachahmende, synthetische Matrix

Das Ergebnis dieser Überlegungen ist eine synthetische Matrix, die auf der Verwendung eines Polyacrylamid-Gels basiert.

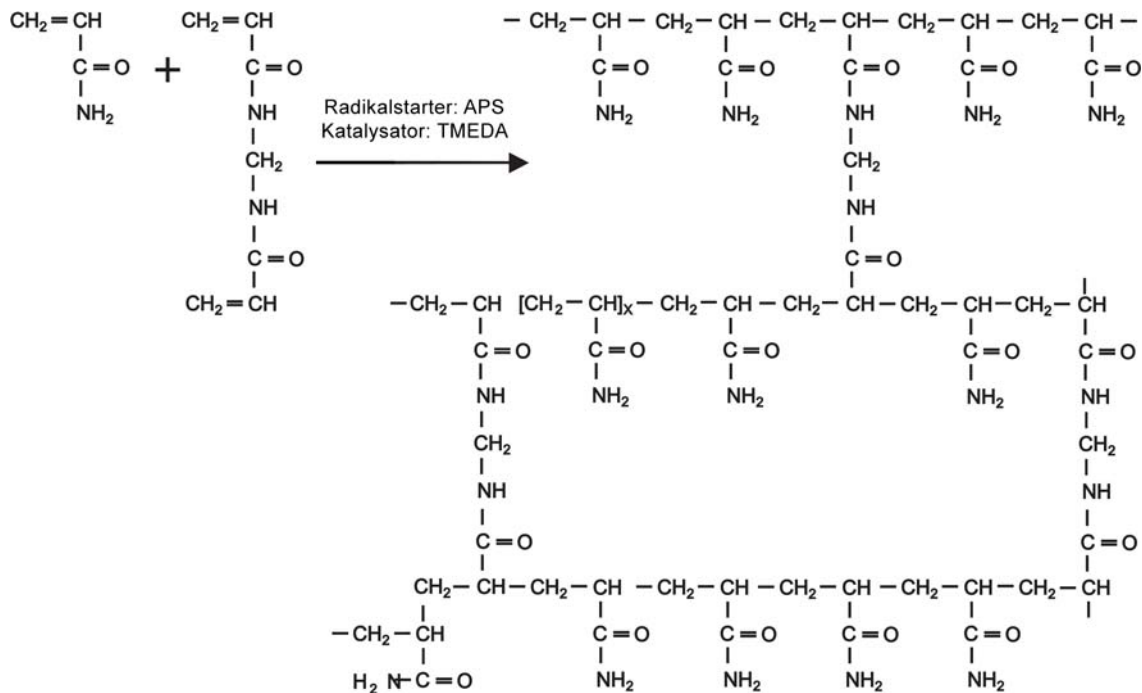
Ein solches Gel besteht aus denselben Hauptelementen (C, H, N, O) wie biologische Gewebe und die physische Beschaffenheit des Gels ist grob gesehen einem Gewebe ähnlich, so dass beispielsweise wie bei Geweben problemlos Kryomikrotomschnitte angefertigt werden können.

Die Herstellung solcher Gele ist aus der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) bekannt<sup>[160,161]</sup> und dort seit mehr als 50 Jahren etabliert<sup>[162]</sup>. Die Edukte zur Herstellung der Gele sind zu moderaten Preisen in hoher Reinheit am Markt verfügbar, so dass Polyacrylamid-Gele für die meisten Elemente wenn überhaupt nur einen vernachlässigbaren ( $< 0,1 \mu\text{g/g}$ ) Elementhintergrund besitzen und auch in größeren Mengen hergestellt werden können.

**Tabelle 31: Synthetische Matrix Polyacrylamid vs. natürliche Matrix**

	<b>Natürliche Matrix</b>	<b>Synthetische Matrix</b>
Verfügbare Matrixmenge	Durch Probengröße limitiert	Käuflich erwerbbar
Kalibrationsstrategie	Standardaddition	Externe, matrixangepasste Kalibration
Ansatz Kalibrationsproben	Viel Vorbereitung	Einfacher Ansatz, bekannt aus PAGE <sup>[160,161]</sup>
Homogenität	Muss durch langes Mahlen und Rühren erreicht werden	Schnell, da Edukte flüssig
Elementhintergrund	Natürlich	Meist $< 0,1 \mu\text{g/g}$
Beschaffenheit	Entspricht dem Gewebe	Ähnlich dem Gewebe
Handhabung	Etwas spröder als Gewebe	Wie Gewebeschnitte
Kalibrationsbereich	Muss ähnlich dem Probengehalt sein	Kann über weiten Bereich erfolgen

Polyacrylamid-Gele werden aus einer wässrigen Lösung aus Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid (BIS) hergestellt, indem zum Start der radikalischen Polymerisation Ammoniumperoxodisulfat (APS) und als Katalysator Tetramethylethyldiamin (TMEDA) zugesetzt werden<sup>[163]</sup>. (siehe Abb. 67)



**Abb. 67: Polymerisationsreaktion von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid zu vernetztem Polyacrylamid<sup>[161]</sup>**

Das BIS hat dabei die Funktion eines Vernetzungsreagenzes. Der Vernetzungsgrad des Gels kann dabei durch Variation des Verhältnisses zwischen Acrylamid und BIS eingestellt werden.

Zwar ist es möglich, zur Herstellung von Polyacrylamid-Gelen fertig angesetzte Acrylamid/BIS-Lösungen (meist 30 % Acrylamid mit 0,8 % BIS) zu verwenden, die es käuflich zu erwerben gibt, um aber ein möglichst großes Flüssigkeitsvolumen zum Anspiken zur Verfügung zu haben, bietet es sich an, den Ansatz der Acrylamid/Bis-Lösung direkt aus den Feststoffen anzusetzen. Der komplette Wasseranteil eines Gels kann anschließend zum homogenen Spiken des Gels mit definierten Elementkonzentrationen genutzt werden.

Der saure pH-Wert der Elementstandardlösungen muss durch einen Puffer abgefangen werden, da er auf die Polymerisation störend wirkt. Dies geschieht durch

die Zugabe der verbreiteten Puffersubstanz Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) ( $pK_s$  8,1<sup>[87]</sup>). Das TRIS spielt aber auf Grund seines von Acrylamid verschiedenen CHNO-Verhältnisses auch eine wichtige Rolle bei der Anpassung der synthetischen Matrix an die Realmatrix.

#### 4.2.2.3 Anpassung des Polyacrylamid-Gels an die nachzuahmende Matrix

Bevor das Polyacrylamid-Gel im CHNO-Elementgehalt an die Realmatrix angepasst werden kann, müssen zunächst die CHNO-Gehalte der Einzelkomponenten ermittelt werden. Dies kann bei stöchiometrischen Verbindungen (z.B. Wasser (H<sub>2</sub>O); TRIS (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>)) einfach rechnerisch geschehen, oder wie bei der Mischung aus Acrylamid mit 2 % BIS durch eine Elementaranalyse.

**Tabelle 32: CHNO-Verhältnisse der Komponenten der synthetischen Matrix**

	O-Gehalt	C-Gehalt	H-Gehalt	N-Gehalt
Wasser	88,9%	0,0%	11,1%	0,0%
Acrylamid mit 2% BIS	23,2%	50,6%	6,9%	19,3%
TRIS	39,6%	39,7%	9,2%	11,6%

Zum Ansatz des an die Matrix angepassten Polyacrylamid-Gels wird zunächst ein immer konstanter Anteil von TRIS vorgelegt, und anschließend die Massenkonzentration der Acrylamid/BIS-Mischung im Gel so gewählt, dass das Gesamt-CHNO-Elementverhältnis dem der Realmatrix möglichst nahe kommt.

**Tabelle 33: Vergleich der CHNO-Verhältnisse der Real- und der synthetischen Matrices**

<b>Matrix</b>	<b>O-Gehalt</b>	<b>C-Gehalt</b>	<b>H-Gehalt</b>	<b>N-Gehalt</b>	<b>Wasser-Gehalt</b>
Schweineleber	71,02%	13,27%	9,98%	2,88%	72,65 %
Nachahmende, synthetische Matrix (PA-Gehalt 20,2%)	71,09%	13,87%	10,08%	4,96%	70,62 %
Säugergewebe allgemein <sup>[1]</sup>	77,13%	7,14%	12,01%	3,72%	
Nachahmende, synthetische Matrix (PA-Gehalt 9,2%)	77,41%	9,02%	10,50%	3,07%	79,9 %
Rattencortex	75,48%	10,64%	10,42%	1,81%	79,4 %
Nachahmende, synthetische Matrix (PA-Gehalt 13,1%)	75,37%	10,59%	10,36%	3,68%	76,9%

Es ist durch die Anpassung des Acrylamid-Gehalts möglich, dem CHNO-Gehalt der Realmatrixes sehr nahe zu kommen. Vergleicht man den in der synthetischen Matrix erreichten Wassergehalt jeweils mit dem in der Realmatrix vorliegenden, so ist auch hier eine gute Annäherung festzustellen.

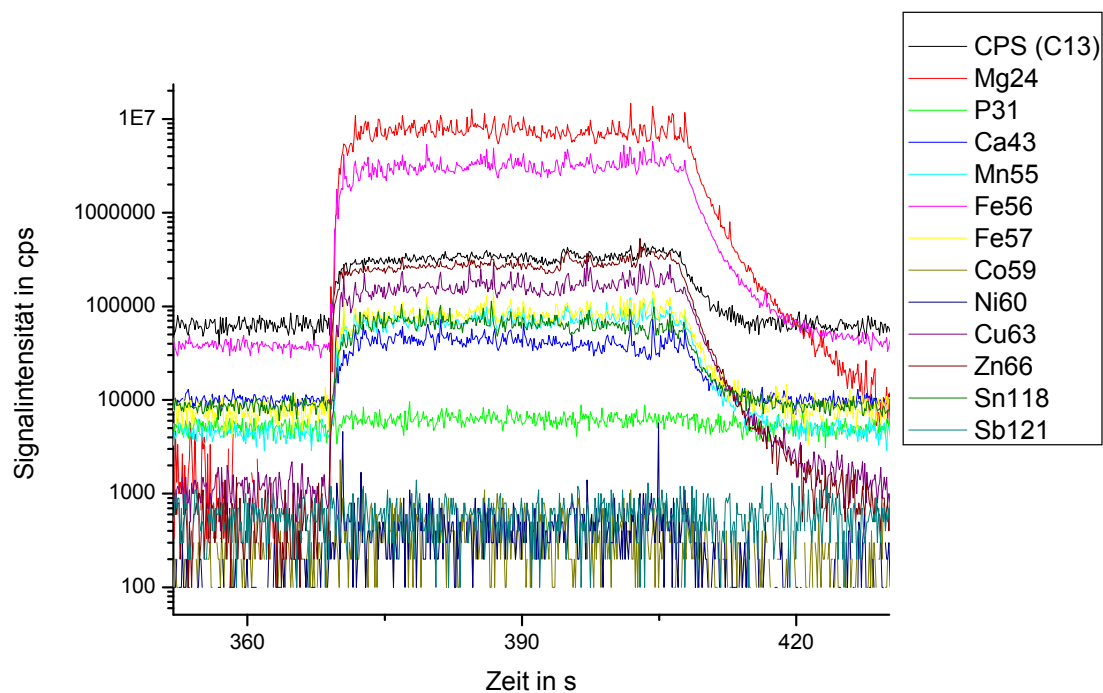
#### **4.2.2.4 Einfluss der PA-Konzentration auf das Analysenergebnis**

Um den Einfluss der Polyacrylamid-Konzentration im Gel auf das Analysenergebnis zu untersuchen, wird eine Reihe von PA-Gelen mit denselben Elementkonzentrationen gespikt, derselben TRIS-Konzentration versetzt und lediglich die PA-Konzentration (5 %; 10 %; 15 %; 20 %) variiert. Als Multielementstandard wird hierfür eine Verdünnung der in Kapitel 4.2.1.2.1, S. 113 beschriebenen Multielementstammlösung mit den in Tabelle 34 aufgeführten Konzentrationen verwendet. Der Ansatz erfolgt in derselben Weise wie die Herstellung der synthetischen, matrixangepassten Polyacrylamidkalibrationsgele (Methodenteil Kapitel 3.5.8, S. 70).

**Tabelle 34: Konzentrationen der Multielementspikelösung zum Ansatz der Gele unterschiedlichen PA-Gehalts**

Element	Konzentration in µg/mL	Standardabweichung in µg/mL
<sup>24</sup> Mg	4181,51	45,58
<sup>43</sup> Ca	1070,91	8,89
<sup>44</sup> Ca	1101,20	7,82
<sup>55</sup> Mn	42,70	0,45
<sup>56</sup> Fe	2945,45	22,39
<sup>57</sup> Fe	2868,07	27,25
<sup>59</sup> Co	0,14	0,00
<sup>60</sup> Ni	1,19	0,02
<sup>63</sup> Cu	330,26	2,34
<sup>65</sup> Cu	331,15	3,54
<sup>66</sup> Zn	1843,84	8,48
<sup>68</sup> Zn	1854,13	8,71
<sup>118</sup> Sn	0,41	0,02

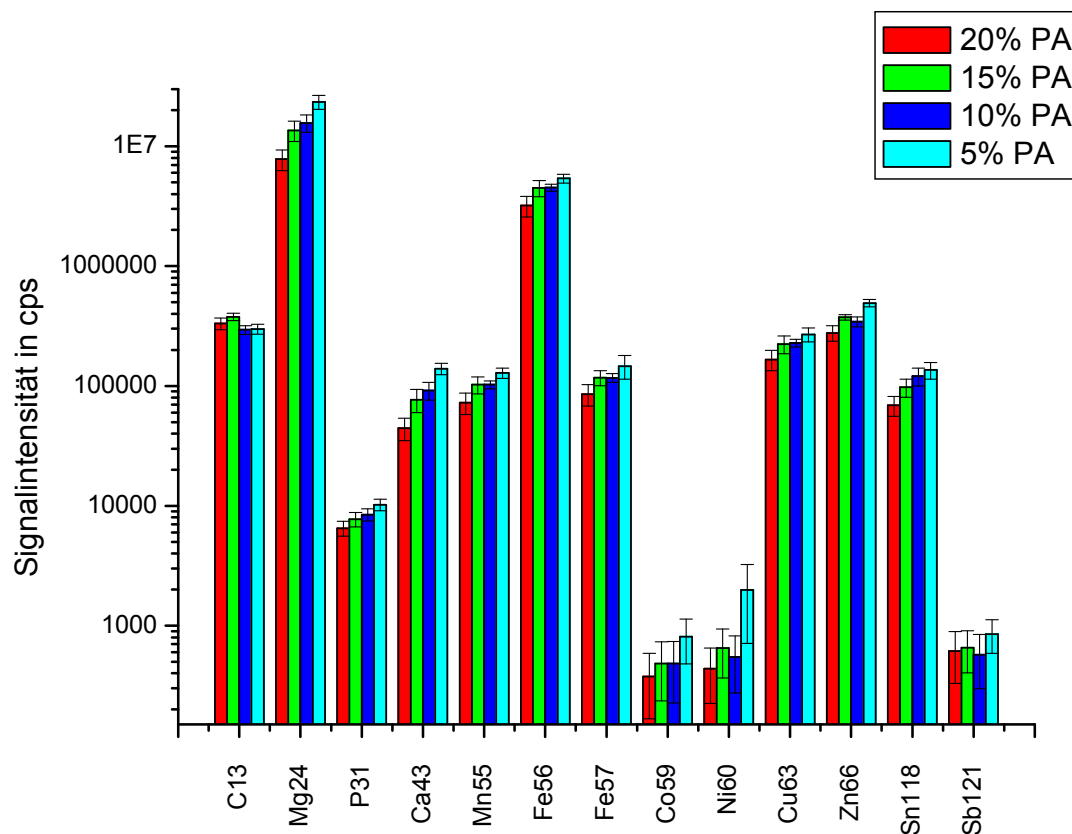
Anschließend werden die Gele mittels Kryomikrotom in jeweils gleichstarke Schnitte (10 µm) geschnitten und auf gereinigte Objektträger aufgebracht. Die Proben werden bei gleicher Energiedichte und identischen Analyseparametern mittels LA-ICP-MS durch je 4 parallele Linienscans analysiert.



**Abb. 68:** Exemplarische Überblicksdarstellung der Elementsignale eines Linienscans der LA-ICP-MS Analyse des 20%igen Polyacrylamidgelschnitts

Die zeitaufgelösten Elementsignale (Abb. 68) der LA-ICP-MS bei der Untersuchung eines gespickten Polyacrylamid-Gelschnitts sind nach einer kurzen Einwaschzeit quasistationär. Da sowohl die Schnittdicke wie auch die Untersuchungsparameter konstant bleiben, kann darauf geschlossen werden, dass die Elementverteilung innerhalb der Polyacrylamid-Gele, wie sie durch die hier beschriebene Methode hergestellt werden, homogen ist.

Zur Bestimmung des Einflusses der Polyacrylamid-Konzentration im Gel auf das Untersuchungsergebnis werden die Signalintensitäten der Analysen der jeweiligen Gele über den quasistationären Bereich des ICP-MS-Signals eines Linienscans durch Mittelwertbildung bestimmt. Abb. 69 gibt einen Überblick über die gefundenen Signalintensitäten im Vergleich mit dem jeweiligen Polyacrylamid-Gehalt. In Tabelle 53, S. 219 befindet sich die Zusammenstellung der hier dargestellten Messwerte.



**Abb. 69: Abnehmende Signalintensitäten der LA-ICP-MS bei steigender Polyacrylamidkonzentration im Gelschnitt und gleichbleibender Elementstandardkonzentration**

Betrachtet man die resultierenden Signalintensitäten, so ist über alle Elemente außer für Kohlenstoff bei sinkendem Polyacrylamid-Gehalt eine deutliche Signalzunahme zu beobachten. Das Kohlenstoffsignal bleibt für alle untersuchten Gehalte annähernd konstant.

Erklärt werden kann dieser Effekt einzig und allein durch die Änderung in der Matrix, da die volumenbezogene Elementkonzentration im Gel in allen Fällen exakt identisch ist.

Ein sensitivitätssteigernder Effekt durch einen höheren Kohlenstoffgehalt wie er für die Elemente Arsen und Antimon im Flüssigkeitsmodus des ICP-MS berichtet wird<sup>[164]</sup>, kann hier im Falle von Antimon (kein zugespikter Standard, sondern aus dem Trägermaterial) nicht beobachtet werden, da die Menge an Kohlenstoff, die durch die Ablation ins Plasma des ICP-MS gelangt, wohl zu gering ist, um einen solchen Effekt auszulösen.



#### 4.2.2.5 Herstellung der synthetischen, matrixangepassten Kalibrationsgele zur externen Kalibration der LA-ICP-MS

Nach der Ermittlung der zu erzielenden Acrylamidkonzentration durch den Abgleich der CHNO-Verhältnisse werden in je einem 15 mL Probenröhrchen die Polymerisationslösungen der matrixnachahmenden Kalibrationsgele angesetzt. Hierzu werden zur Nachahmung von Schweineleber 2,86 g Acrylamid/BIS Mischung (entspricht 20,2 % Polyacrylamid) und 1,3 g TRIS zu 10 mL der entsprechenden Multielementstandardlösung eingewogen und bis zum vollständigen Lösen der Feststoffe langsam geschüttelt.

Um später beide Kalibrationsmethoden direkt miteinander vergleichen zu können, werden als Multielementstandardlösung Verdünnungen der bereits bei der Standardaddition verwendeten Multielementstammlösung verwendet (Siehe Tabelle 35).

**Tabelle 35: Zusammensetzung der Multielementstandardlösungen zum Ansatz der synthetischen Kalibrationsgele**

<b>Isotop</b>	<b>Verdünnung 1:19 Elementkonzentration in µg/g</b>	<b>Verdünnung 1:39 Elementkonzentration in µg/g</b>	<b>Verdünnung 1:79 Elementkonzentration in µg/g</b>
<sup>24</sup> Mg	855,979	427,990	213,995
<sup>43</sup> Ca	216,286	108,143	54,071
<sup>44</sup> Ca	210,730	105,365	52,683
<sup>55</sup> Mn	9,002	4,501	2,251
<sup>56</sup> Fe	580,131	290,065	145,033
<sup>57</sup> Fe	584,342	292,171	146,086
<sup>59</sup> Co	0,030	0,015	0,008
<sup>60</sup> Ni	0,257	0,129	0,064
<sup>63</sup> Cu	70,019	35,010	17,505
<sup>65</sup> Cu	71,572	35,786	17,893
<sup>66</sup> Zn	390,784	195,392	97,696
<sup>68</sup> Zn	395,681	197,840	98,920
<sup>116</sup> Sn	0,206	0,103	0,051
<sup>118</sup> Sn	0,300	0,150	0,075
<sup>120</sup> Sn	0,210	0,105	0,052

Die gespikete Acrylamidlösung hat nun auf Grund des TRIS einen pH-Wert von 8. Zum Starten der Polymerisation werden 100 µL 10% APS-Lösung und 8 µL TMEDA

als Katalysator hinzugesetzt und die Reaktionslösung schnell durch Schütteln homogenisiert. Jeweils 600  $\mu\text{L}$  der Lösung werden in gereinigte Cryomolds pipettiert und anschließend mit einem Deckel abgedeckt. Nach ca. 15 min ist das Reaktionsgemisch zu einem Gel erstarrt. Um die Polymerisation zu vervollständigen, wird noch einmal 30 min gewartet. Anschließend werden die in den Cryomolds befindlichen Kalibrationsgele auf einen mit dem Fuß in flüssigem Stickstoff stehenden Aluminiumblock ( $-195\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) gestellt. Die Gele werden auf diese Weise schockgefroren. Die gefrorenen Gele können nun bis zur weiteren Verwendung gelagert werden oder direkt dem Kryomikrotom zur Herstellung dünner Schnitte zugeführt werden.

#### **4.2.2.6    Elementeintrag durch Gelkomponenten eines ungespikten, synthetischen, matrixangepassten Polyacrylamidgels**

Ein niedriger Elementhintergrund im Kalibrationsgel ist für die Kalibration der LA-ICP-MS von Vorteil, denn mit einem erhöhten Hintergrundsignal steigt immer auch dessen Signalrauschen ( $\sigma$ ). Diese Erhöhung wiederum führt direkt zu einer Verschlechterung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses und in Folge dessen auch zu einer Verschlechterung der Nachweisgrenze<sup>[165]</sup>.

Aus diesem Grund wird im Folgenden für die externe Kalibrationsmethode mittels synthetischer, matrixnachahmender Polyacrylamidgele untersucht, wie hoch der Elementeintrag durch die Gelkomponenten an sich in einem solchen Gel ist.

Hierfür wird ein entsprechendes nicht gespiktes Polyacrylamid-Gel mittels Mikrowellendruckaufschluss aufgeschlossen und auf seine enthaltenen Elementkonzentrationen untersucht. Die gefundenen Konzentrationen sind in der folgenden Tabelle 36 aufgeführt.

**Tabelle 36: Durch Gelkomponenten eingetragene Hintergrundkonzentrationen im synthetischen, matrixnachahmenden Polyacrylamid-Gel**

Isotop	Hintergrundkonzentration in µg/g	Standardabweichung in µg/g
<sup>24</sup> Mg	1,120	0,2012
<sup>43</sup> Ca	2,493	0,3306
<sup>44</sup> Ca	4,264	0,2303
<sup>55</sup> Mn	0,039	0,0021
<sup>56</sup> Fe	22,405	0,2084
<sup>57</sup> Fe	3,852	0,0736
<sup>59</sup> Co	0,001	0,0003
<sup>60</sup> Ni	0,016	0,0048
<sup>63</sup> Cu	0,069	0,0014
<sup>65</sup> Cu	0,052	0,0014
<sup>66</sup> Zn	0,125	0,0141
<sup>68</sup> Zn	0,142	0,0145
<sup>116</sup> Sn	0,055	0,0080
<sup>118</sup> Sn	0,090	0,0104
<sup>120</sup> Sn	0,060	0,0034

Üblicherweise liegen die Nachweisgrenzen der LA-ICP-MS bei Elementkonzentrationen >0,1 µg/g. Die meisten der untersuchten Elemente (Mn, Co, Ni, Cu, Sn) weisen im nicht gespickten Gel Konzentrationen von <0,1 µg/g auf, so dass keine signifikante negative Beeinflussung der Nachweisgrenze angenommen werden kann. Auch bei Zink (Zn) liegt die Konzentration gerade eben im Bereich üblicher Nachweisgrenzen, so dass auch hier nur eine geringe Verschlechterung der Nachweisgrenze auf Grund des Hintergrunds zu befürchten ist.

Lediglich für die Elemente Magnesium (Mg), Calcium (Ca) und Eisen (Fe) werden mehr als 1 µg/g gefunden, wobei der Wert für das Eisenisotop 56 (<sup>56</sup>Fe) auf Grund der Argonoxid (<sup>40</sup>Ar<sup>16</sup>O<sup>+</sup>) basierten molekularen, isobaren Interferenz überhöht ist, wie der Vergleich mit dem Eisenisotop <sup>57</sup>Fe zeigt.

Aber auch für Analysen dieser Elemente kann die externe Kalibration der LA-ICP-MS mittels matrixangepasster Polyacrylamid-Gele sinnvoll eingesetzt werden, da die physiologischen Konzentrationen in der Schweineleber (Tabelle 26, S. 111) sowie auch allgemein im Menschen <sup>[158]</sup> deutlich mehr als eine Größenordnung über der Hintergrundkonzentration liegen.

Die genaue Berechnung der Nachweisgrenzen der Kalibrationsmethode mittels synthetischer, matrixnachahmender Polyacrylamid-Gelschnitte erfolgt erst mit der Kalibration der LA-ICP-MS, die in Kapitel 4.2.2.8, S. 134 vorgestellt wird.

Eine andere Störungsquelle, die in einer Erhöhung des Elementhintergrundes resultiert, ist der Elementeintrag durch Ablation des Trägermaterials. Bei den hier verwendeten Probenträgern handelt es sich in der Regel um normale Kalk-Soda- oder Duran-Glas-Objekträger, so dass bei der Untersuchung eines Gewebeschnittes oder eines Kalibrationsgels neben Silicium auch erhöhte Hintergrundsignale von Natrium, Magnesium und Calcium zu beobachten sind. Durch geeignete Wahl der Ablationsparameter (insbesondere der Schussfrequenz und der Energiedichte) kann das Verdampfen des Untergrundmaterials unter dem Gewebeschnitt zwar reduziert, jedoch nie vollkommen ausgeschlossen werden.

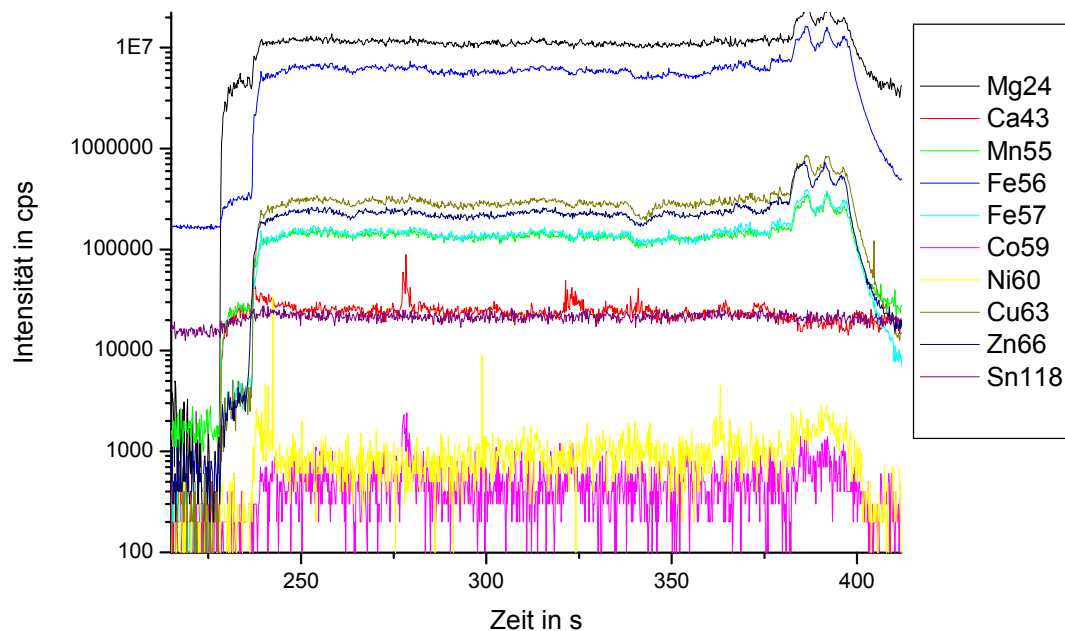
Eine Lösung dieses Problems liegt in der Verwendung von reinen Quarzglasprobenträgern als Probenträgermaterial, da es zusätzlich zur höheren Reinheit auch den Vorteil hat, dass es bei einer Wellenlänge von 213 nm keine UV-Absorption besitzt<sup>[87]</sup>. Ebenso bleibt die Durchlässigkeit im sichtbaren Wellenlängenbereich für etwaige mikroskopische Untersuchungen vollständig erhalten im Gegensatz zur potentiellen Verwendung von hochreinen Siliciumwavern als Träger.

#### **4.2.2.7 Kalibration der LA-ICP-MS mittels synthetischer, matrixangepasster Kalibrationsstandards zur Bestimmung von Elementkonzentrationen in Schweineleber**

Zur Kalibration des LA-ICP-MS mittels gespikter, synthetischer, matrixangepasster Kalibrationsgele werden die Gele mittels Kryomikrotom in derselben Dicke geschnitten wie die zu untersuchenden Gewebeschnitte. Die Kalibrationsgelschnitte werden auf die gleichen Träger aufgebracht wie die Gewebeschnitte (z. B. gereinigte Objekträger). Die Messung der Kalibrationsproben findet durch Verwendung derselben Analyseparameter wie bei den Gewebeproben statt (Energiedichte, Spotgröße, Linienabstand, Schussfrequenz, ICP-MS-Parameter usw.). Da es zur Kalibration der LA-ICP-MS nicht notwendig ist, den kompletten Kalibrationsgelschnitt zu analysieren, werden fünf parallele, dem Linienabstand entsprechend

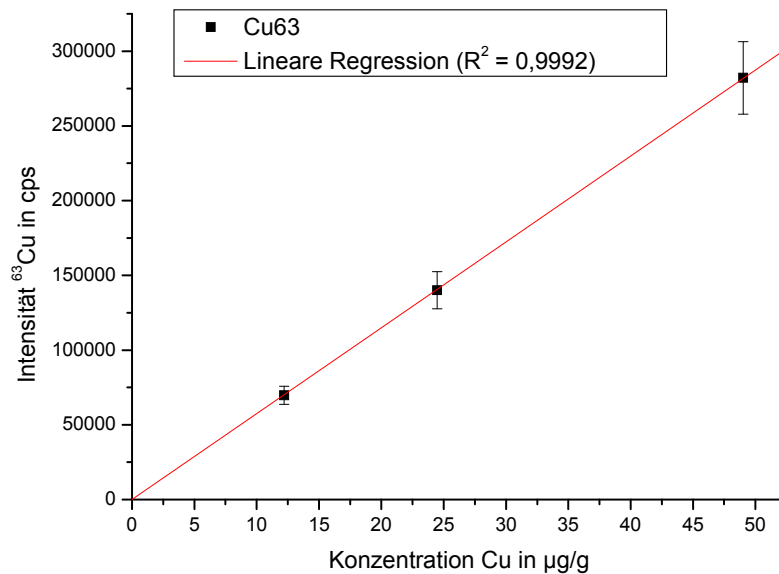
überlappende Linienscans über den Schnitt programmiert und analysiert. Da die Linienscans wie bei der Gewebeuntersuchung überlappen, wird das ICP-MS-Signal des ersten nicht der Auswertung zugeführt. Der erste Linienscan dient ausschließlich zur Reduktion der Analysenfläche des nächsten Scans um den überlappenden Betrag, so dass ab dem zweiten Scan dieselbe Probenoberfläche je Linienscan wie bei der Gewebeuntersuchung für die Kalibration verwendet wird.

Die Signalintensitäten der Linienscans werden über den quasistationären Bereich des Elementsignals (siehe Abb. 70) gemittelt, hintergrundkorrigiert und anschließend direkt zusammen mit der ebenfalls hintergrundkorrigierten Spikekonzentration im Gel zur Kalibration verwendet.



**Abb. 70:** Exemplarische Darstellung der Elementsignale eines Linienscans der LA-ICP-MS-Untersuchung eines gespikten, synthetischen, matrixangepassten Kalibrationsgels

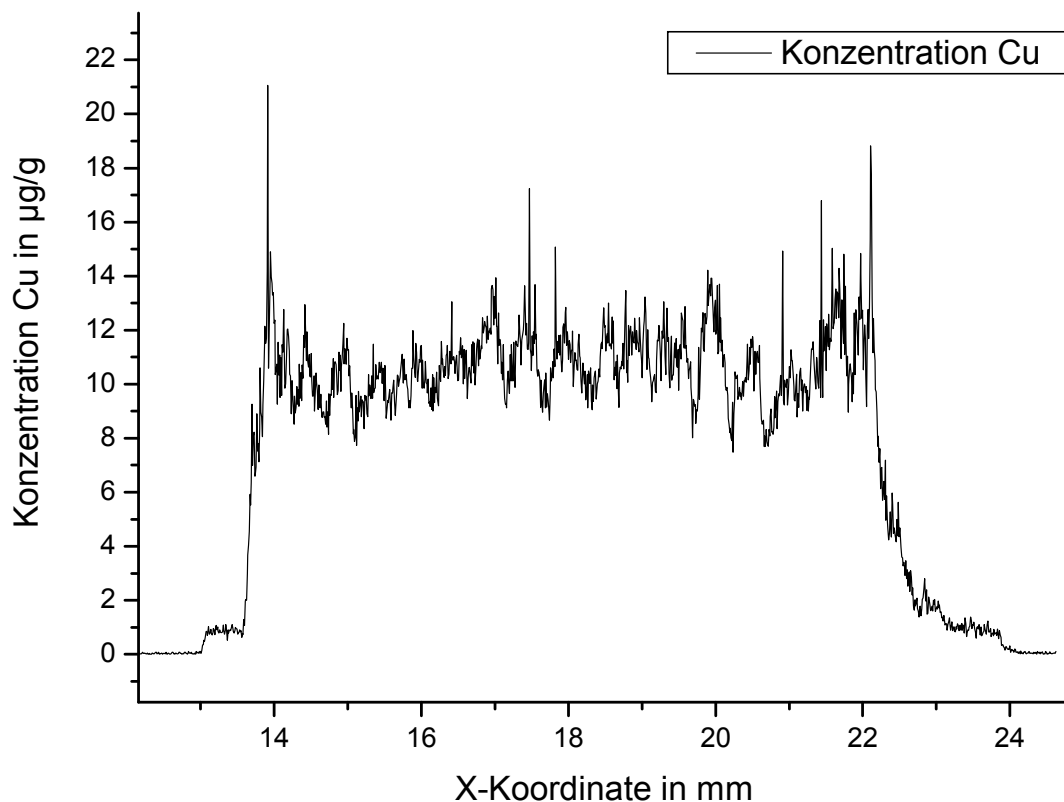
Durch Auftragung der jeweiligen Signalintensitäten gegen die entsprechenden Konzentrationen wird durch lineare Regression je Isotop eine Kalibrationsgerade aufgestellt (Siehe Abb. 71 sowie im Anhang Abb. 100 bis Abb. 106, S. 224ff.). Diese zeigen über den jeweils untersuchten Bereich eine gute Linearität mit einem Korrelationskoeffizient ( $R^2$ ) von  $>0,99$  für alle kalibrierten Isotope.



**Abb. 71:** Kalibrationsgerade der LA-ICP-MS für das Isotop <sup>63</sup>Cu mittels synthetischer, matrixangepasster Polyacrylamid-Gele zur Untersuchung von Schweineleber

Zur orts aufgelösten Quantifizierung von Elementkonzentrationen in Schweineleber werden die Signalintensitäten des orts aufgelösten Scans direkt über die jeweiligen Regressionsgeradengleichungen in Konzentrationen umgerechnet (Abb. 72). Zur besseren Übersichtlichkeit wird hier nur das Ergebnis einer eindimensional orts aufgelösten Messung gezeigt. Die anatomisch bedingten Konzentrationsschwankungen im Schweinelebergewebe lassen sich darin deutlich von der normalen Standardabweichung der LA-ICP-MS unterscheiden.

Die Anwendung der Kalibration der LA-ICP-MS auf zweidimensionale Elementverteilungen kann in exakt derselben Weise erfolgen, da es sich letzten Endes auch nur um eine Serie einzelner eindimensionaler Linienscans handelt.



**Abb. 72:** Eindimensional orts aufgelöste Kupferverteilung eines Schweinelebergewebeschnittes aufgenommen mittels eines Linienscans des LA-ICP-MS nach dessen Kalibration mittels gespikter, synthetischer, matrixangepasster Polyacrylamid-Gelschnitte

#### 4.2.2.8 Nachweisgrenzen des Kalibrationsverfahrens der LA-ICP-MS mittels gespikter, matrixangepasster Polyacrylamid-Gelschnitte

Die Nachweisgrenzen des mittels synthetischer, matrixangepasster Polyacrylamid-Gelschnitte kalibrierten LA-ICP-MS werden entsprechend der Literatur<sup>[35,101,165]</sup> wie folgt berechnet:

$$I_{NWG} = I_{Hintergrund} + 3\sigma$$

##### Gleichung 1

Hierbei ist  $I_{Hintergrund}$  die Signalintensität des Hintergrundsignals und  $\sigma$  dessen Standardabweichung (auch Signalrauschen genannt). Durch Einsetzen in die

umgeformte Kalibrationsgeradengleichung erhält man die Konzentration  $c_{NWG}$ , die der Nachweisgrenze entspricht.  $b_{Kalibration}$  ist der y-Achsenabschnitt der Kalibrationsgerade und  $m_{Kalibration}$  deren Geradensteigung (Gleichung 2).

$$c_{NWG} = \frac{I_{NWG} - b_{Kalibration}}{m_{Kalibration}}$$

### Gleichung 2

Daraus ergeben sich die Nachweisgrenzen der Analyten für die hier vorgestellte Kalibrationsmethode wie folgt:

**Tabelle 37: Nachweisgrenzen der mittels synthetischer, matrixangepasster Polyacrylamid-Gelschnitte kalibrierten LA-ICP-MS**

Isotop	Nachweisgrenze in µg/g
<sup>24</sup> Mg	54,698
<sup>43</sup> Ca	69,680
<sup>55</sup> Mn	0,556
<sup>56</sup> Fe	5,008
<sup>57</sup> Fe	7,291
<sup>59</sup> Co	0,019
<sup>60</sup> Ni	0,179
<sup>63</sup> Cu	0,316
<sup>66</sup> Zn	1,145

Die Nachweisgrenzen der meisten Isotope sind in der für die LA-ICP-MS typischen Spanne vom oberen ng/g-Bereich bis in den unteren µg/g-Bereich. Für <sup>24</sup>Mg und <sup>43</sup>Ca übersteigt die Nachweisgrenze diesen Bereich deutlich. Grund dafür sind die hohen Konzentrationen beider Elemente im verwendeten Trägermaterial (Objektträger aus Glas), die jeweils ein hohes Hintergrundsignal liefern. Für <sup>59</sup>Co und <sup>60</sup>Ni sind auf Grund ihrer geringen Konzentrationen in der verwendeten Verdünnung der Multielementstammlösung nur Ein-Punkt-Kalibrationen möglich, da beide Elemente nur in der am höchsten konzentrierten Kalibrationsprobe (1:19) eindeutig nachweisbar sind.



Für  $^{118}\text{Sn}$  konnte die LA-ICP-MS nicht kalibriert und auch keine Nachweisgrenze bestimmt werden, da die verwendeten Konzentrationen in den Kalibrationsproben nicht nachweisbar waren.

Eine Optimierung der Nachweisgrenzen bei den durch einen erhöhten Hintergrund gestörten Elementen Magnesium und Calcium kann erreicht werden, indem auf Trägermaterialien zurückgegriffen wird, die keinen der Analyten enthalten, zum Beispiel reines Quarzglas (siehe Kapitel 4.2.2.6, S. 129).

#### **4.2.2.9 Vergleich der Ergebnisse der LA-ICP-MS nach externer Kalibration mittels matrixangepasster Kalibrationsgele mit den Resultaten des aufgeschlossenen Gewebes sowie Bestimmung der Wiederfindungsraten der Analyten**

Zum Vergleich der Ergebnisse der aufgeschlossenen Schweineleberproben mit den Ergebnissen der LA-ICP-MS, werden zunächst pro Element die mittleren Konzentrationen aus vier Linienscans ermittelt. Die erhaltenen Werte werden in Tabelle 38 den Aufschlussdaten gegenübergestellt und die Wiederfindungsraten bestimmt.

**Tabelle 38: Vergleich der Quantifizierungsergebnisse von Schweineleber der mittels synthetischer, matrixangepasster Polyacrylamid-Gelschnitte kalibrierten LA-ICP-MS mit den ICP-MS-Ergebnissen des aufgeschlossenen Schweinelebergewebes**

Element	ICP-MS nach Mikrowellendruckaufschluss		Mittels synthetischer, matrixangepasster Gelschnitte kalibrierte LA-ICP-MS		Wiederfindungsrate
	Konzentration in µg/g	SD	Konzentration in µg/g	SD	
<sup>24</sup> Mg	158,514	2,220	173,57	40,483	109,5%
<sup>43</sup> Ca	49,006	5,459	n.n.	n.n.	n.n.
<sup>55</sup> Mn	2,14	0,049	2,30	0,327	107,6%
<sup>56</sup> Fe	107,925	4,666	101,27	9,899	93,8%
<sup>57</sup> Fe	99,012	1,984	101,77	11,659	102,8%
<sup>59</sup> Co	0,011	0,001	n.q.	n.q.	n.q.
<sup>60</sup> Ni	0,056	0,004	n.n.	n.n.	n.n.
<sup>63</sup> Cu	9,049	0,171	10,26	1,203	113,3%
<sup>66</sup> Zn	59,378	0,650	96,07	8,600	161,8%
<sup>118</sup> Sn	0,254	0,058	n.n.	n.n.	n.n.

Die Werte des aufgeschlossenen Schweinelebergewebes können mit dem Verfahren der LA-ICP-MS nach externer, matrixangepasster Kalibration für alle bestimmbar Elemente im Rahmen der jeweiligen Standardabweichungen außer für <sup>66</sup>Zn bestätigt werden. Die gefundenen Konzentrationen liegen somit auch hier wie bei den Aufschlussdaten (Kapitel 4.2.1.1.4, S. 110) bereits erwähnt im Bereich der natürlich vorkommenden, typischen Konzentrationen für Schweineleber. Für <sup>66</sup>Zn liegt die gefundene Konzentration deutlich über der im Aufschluss bestimmten, was möglicherweise an einer Kontamination der Probe durch Zink liegt.

Die Wiederfindungsraten liegen für die mittels LA-ICP-MS bestimmbar Elemente außer für <sup>66</sup>Zn zwischen 94 % und 113 %. Die auffällig große Standardabweichung bei der Bestimmung von <sup>24</sup>Mg liegt darin begründet, dass der Elementhintergrund für Magnesium durch das im Glasträger vorhandene Magnesium stark erhöht ist, so dass die bestimmte Konzentration von Magnesium trotz des hohen Wertes von > 100 µg/g relativ nahe der Nachweisgrenze liegt.

Es fällt auf, dass die Wiederfindungsraten durchschnittlich knapp über 100 % liegen, wobei der Mehrbefund sich jedoch im Rahmen der Standardabweichung bewegt und somit keine signifikante Abweichung vom Aufschlussresultat besteht. Diese kleine systematische Abweichung ist unabhängig vom untersuchten Isotop und Konzentrationsbereich und deutet auf eine minimale Abweichung des Verhaltens der Matrizes Schweineleber und Polyacrylamid-Gel bei der Untersuchung mittels LA-ICP-MS hin. Die Abweichung ist jedoch so gering, dass für die Untersuchung von Schweineleber eine erfolgreiche valide Kalibration der LA-ICP-MS mittels gespikter, synthetischer, matrixangepasster Polyacrylamid-Gele durchgeführt werden kann. Ein im CHNO-Verhältnis an Schweineleber angepasstes Polyacrylamid-Gel kann also die Matrix Schweineleber erfolgreich für die LA-ICP-MS imitieren.

#### **4.2.2.10 Vergleich der matrixangepassten, externen Kalibration mit der Standardadditionstechnik**

Vergleicht man die in Schweineleber durch die LA-ICP-MS gefundenen Konzentrationen beider Kalibrationstechniken (Tabelle 39), so liefern beide die gleichen Ergebnisse, die, wie der jeweilige Einzelvergleich mit den Resultaten des aufgeschlossenen Gewebes bestätigt, beide valide sind. Im direkten Vergleich ist festzustellen, dass die externe, matrixangepasste Kalibration im Allgemeinen Ergebnisse mit einer geringeren Standardabweichung liefert als die Standardaddition. Die Ursache hierfür liegt darin begründet, dass bei der externen Kalibration die Probenkonzentration innerhalb des kalibrierten Bereiches liegt, wohingegen bei der Standardaddition die Kalibrationsgerade bis zum x-Achsen Schnittpunkt extrapoliert wird, an dem das Vertrauensintervall naturgemäß breiter ist.

**Tabelle 39: Vergleich der Quantifizierungsergebnisse von Schweineleber der mittels synthetischer, matrixangepasster Polyacrylamid-Gelschnitte und der mittels Standardaddition kalibrierten LA-ICP-MS**

Element	Mittels synthetischer, matrixangepasster Gelschnitte kalibrierte LA-ICP-MS		Mittels Standardaddition kalibrierte LA-ICP-MS	
	Konzentration in µg/g	SD	Konzentration in µg/g	SD
<sup>24</sup> Mg	173,57	40,483	171,674	36,799
<sup>55</sup> Mn	2,30	0,327	2,219	0,373
<sup>56</sup> Fe	101,27	9,899	91,247	18,274
<sup>57</sup> Fe	101,77	11,659	115,08	42,646
<sup>63</sup> Cu	10,26	1,203	9,632	4,148
<sup>66</sup> Zn	96,07	8,600	81,724	22,303

Ein direkter Vergleich der Nachweisgrenzen beider Kalibrationsverfahren (Tabelle 40) liefert stark unterschiedliche Werte für dasselbe untersuchte Isotop, obwohl beide Verfahren identische Analysenparameter (LA und ICP-MS) verwenden. Erklärt werden kann dieser Unterschied durch die starke Abhängigkeit der Nachweisgrenze der Standardaddition von der Konzentration in der nicht beaufschlagten Probe, da beim Verfahren der Standardaddition kein Blank als Bezugsmessung zu deren Berechnung herangezogen werden kann, sondern die nicht gespikete Probe verwendet wird.

**Tabelle 40: Gegenüberstellung der Nachweisgrenzen beider angewandeter Kalibrationsverfahren**

<b>Isotop</b>	<b>Nachweisgrenzen der externen Kalibration der LA-ICP-MS mittels matrixangepasster, gespikter Polyacrylamid-Gelschnitte in µg/g</b>	<b>Nachweisgrenzen der mittels Standardaddition kalibrierten LA-ICP-MS in µg/g</b>
<sup>24</sup> Mg	54,698	98,485
<sup>43</sup> Ca	69,680	nicht kalibriert
<sup>55</sup> Mn	0,556	1,041
<sup>56</sup> Fe	5,008	59,268
<sup>57</sup> Fe	7,291	62,618
<sup>59</sup> Co	0,019	nicht kalibriert
<sup>60</sup> Ni	0,179	nicht kalibriert
<sup>63</sup> Cu	0,316	3,773
<sup>66</sup> Zn	1,145	20,802

Rein von den Ergebnissen sind beide Verfahren gut dazu geeignet, die Elementkonzentrationen in Schweineleber zu bestimmen. Deutliche Unterschiede liegen jedoch in der praktischen Anwendung und Vorbereitung der Kalibrationsproben.

Die Methode der Standardaddition benötigt zum Beispiel relativ große Mengen an Probenmaterial, um alle Kalibrationsproben anzusetzen und den Flüssigkeitsgehalt zu bestimmen. Für die externe Kalibration wird lediglich der zu untersuchende Gewebeschnitt und Probenmaterial für eine CHNSO-Untersuchung gebraucht. Bei mengenmäßig limitierten Probenmaterialien wie biologischen Geweben ist dies von Vorteil, da Messwerte nur innerhalb eines Individuums sinnvoll zu interpretieren sind. Ein weiterer Vorteil der externen Kalibrationstechnik gegenüber der Standardaddition ist die problemlose Messung von Blindwerten, so dass beispielsweise schnell auf ein hohes Hintergrundsignal geschlossen werden kann. Die vielleicht nahe liegende Messung der Hintergrundintensität in Nachbarschaft zum untersuchten Gewebeschnitt ist hierfür jedenfalls nicht geeignet, da hier die Matrix des Gewebes fehlt und somit andere Matrixbedingungen herrschen. Solche vermeintlichen Blindwerte liefern keine sinnvollen Resultate.

Die Probenvorbereitung zur Kalibration benötigt bei beiden Methoden deutlich mehr Zeit als das Ansetzen der Kalibrationslösungen der ICP-MS im Flüssigkeitsmodus,

da die Kalibrationsproben erst angesetzt werden müssen und auch der Schneidevorgang einige Zeit in Anspruch nimmt. Der Ansatz der Standardadditionsproben ist allerdings wesentlich zeitaufwändiger als der Ansatz der synthetischen Polyacrylamid-Gele. Beim Standardadditionsverfahren ist die wesentliche Schwierigkeit das Erreichen einer genügend hohen Homogenität, da die Größenordnung, in welcher der Laser die Probe untersucht, im Mikrometerbereich liegt. Diese kann durch einen intensiven Mahlvorgang erreicht werden, dauert aber seine Zeit. Beim Ansatz der Polyacrylamid-Gele ist das Erreichen der Homogenität trivial, da zu Beginn alle Komponenten in Lösung vorliegen, die durch vorsichtiges Schütteln schnell homogenisiert werden können.

**Tabelle 41: Anwendungsrelevante Eigenschaften der beiden angewandten Kalibrationsmethoden**

<b>Angewandte Kalibrationstechnik der LA-ICP-MS</b>	<b>Standardaddition</b>	<b>Externe matrixangepasste Kalibration durch synthetische Matrix</b>
Matrixmenge	Verfügbarkeit oft auf geringe Mengen limitiert	Preiswert ausreichend zu erwerben
Elementhintergrund	Natürlich vorkommend, sowie Trägermaterial	Oft < 0,1 µg/g im Gel sowie Trägermaterial
Spezielle Verfahren	Wassergehaltsbestimmung	CHNO-Bestimmung
Probenvorbereitung	sehr zeitaufwendig	einfacher Ansatz, bekannt aus PAGE <sup>[160,161]</sup>
Homogenisierung	durch langes Mahlen und Rühren	Schnell, da Edukte flüssig
Beschaffenheit	Entspricht dem Gewebe	Ähnlich dem Gewebe
Schnittverhalten	Etwas spröder als Gewebe	Wie Gewebeschnitte
Blindwert	nicht bestimmbar	einfach bestimmbar
Kalibrationsbereich	Muss ähnlich dem Probengehalt sein	Kann über weiten Bereich erfolgen

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es durch im CHNO-Verhältnis und im Wassergehalt an die organische Matrix angepasste Polyacrylamid-Gele möglich ist, das Ablationsverhalten der Matrix Schweineleber soweit zu imitieren, dass eine sinnvolle, externe Kalibration durch derartige Gelschnitte ermöglicht wird. Die

Anwendung der Methode auf andere Gewebearten als Schweineleber kann analog erfolgen.

Beide Verfahren, das der externen Kalibration durch synthetische, matrixangepasste Polyacrylamid-Gelschnitte sowie das der Standardaddition, sind von den Ergebnissen her gleich gut zur Kalibration der LA-ICP-MS geeignet. Jedoch ist das Erste wesentlich einfacher in der Herstellung der Standards und der Anwendung. Im Hinblick auf die Untersuchung von mengenmäßig limitierten Gewebeproben hat die externe, matrixangepasste Kalibrationsmethode zudem den wichtigen Vorteil, nicht materialintensiv zu sein. Ein weiterer Vorteil ist das problemlose Erreichen der Homogenität der Kalibrationsproben im Mikrometerbereich.

Beide Methoden sind multielementfähig und auf einen großen Konzentrationsbereich anwendbar. Die einmal angesetzten Standardproben sind in der noch nicht geschnittenen Form fast beliebig lange bei -80 °C stabil und können bei Bedarf zusammen mit den zu untersuchenden Gewebeproben geschnitten werden.

Die Methode der externen, matrixangepassten Kalibration mittels gespikter Gelschnitten bietet sich also als sinnvolle einfache Alternative zur Standardaddition an, um das Problem der hohen Matrixabhängigkeit bei der Bestimmung von Elementkonzentrationen in Gewebeschnitten mittels LA-ICP-MS zu lösen.

### **4.3      *Untersuchung einzelner Zellen mittels LA-ICP-MS***

#### **4.3.1      Entwicklung einer Untersuchungsmethode zur gezielten Analyse einzelner Zellen einer Zellkultur auf einem Objektträger**

Die Laser-Ablation als Probenzuführung zur ICP-MS bietet eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten insbesondere auf eine zunehmende Anzahl von biologischen Fragestellungen.

Die hier gezeigte, neu entwickelte Anwendung verknüpft die bereits seit langem in den Biowissenschaften wie zum Beispiel der Genetik übliche Methode, einzelne Zellen einer Zellkultur unter dem Mikroskop zu untersuchen, mit der Möglichkeit, mittels LA-ICP-MS Elementinformationen der betrachteten, einzelnen Zellen zu erhalten.

Üblicherweise werden Zellen einer Zellkultur auf einen Objektträger so aufgetropft, dass diese an dessen Oberfläche anhaften (Methodenteil: Kapitel 3.5.11.2, S. 75). Nach Abwaschen des Zellkulturmediums und Trocknung des Objektträgers erfolgt üblicherweise die optische Untersuchung mit einem Licht- oder Fluoreszenzmikroskop<sup>[166]</sup>.

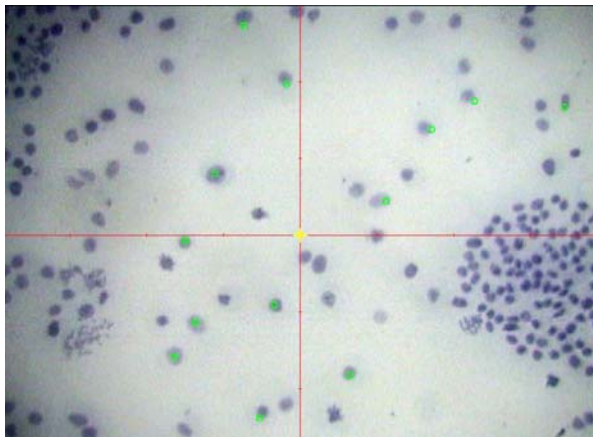
Je nach Fragestellung sind zwei Fälle einer Anwendung der LA-ICP-MS auf einzelne Zellen denkbar.

Zum einen kann es Fragestellungen geben, die ausschließlich den Elementgehalt einzelner Zellen betreffen, bei denen aber ein Gesamtaufschluss einer Suspension von Zellen keinen Informationsgewinn verspricht (zum Beispiel die Bestimmung der Akkumulation eines Elements in Makrophagen (Fresszellen) einer kontaminierten Vollblutprobe).

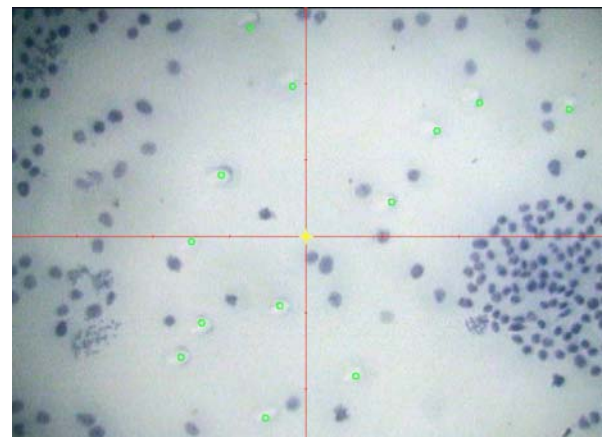
Zum anderen mag es sinnvoll sein, eine Untersuchung mittels LA-ICP-MS zusätzlich zu mikroskopischen Untersuchungen durchzuführen. Beispielsweise wie weiter unten (Kapitel 4.3.3.3, S.167) gezeigt die mikroskopische Untersuchung von Zellen im Stadium der Metaphase zum Auffinden von Chromosomenaberrationen und anschließend die Untersuchung derselben Zellen mittels LA-ICP-MS zur Bestimmung des von ihnen gebundenen *cis*-Platins, welches die Ursache dieser Mutationen bildet.



Im Falle der ausschließlichen Untersuchung einzelner Zellen mittels LA-ICP-MS erfolgt direkt nach der Eingabe der Probe in die Ablationskammer die Programmierung der Koordinaten der zu untersuchenden Zellen (Abb. 73), sowie der benötigten Ablationsparameter. Die Zellen können sofort nach der Vorwärmzeit des Lasers und dem Spülen der Ablationskammer mit Helium mittels ICP-MS analysiert werden. Zur absoluten Quantifizierung ist eine weiter unten beschriebene externe Kalibration möglich.

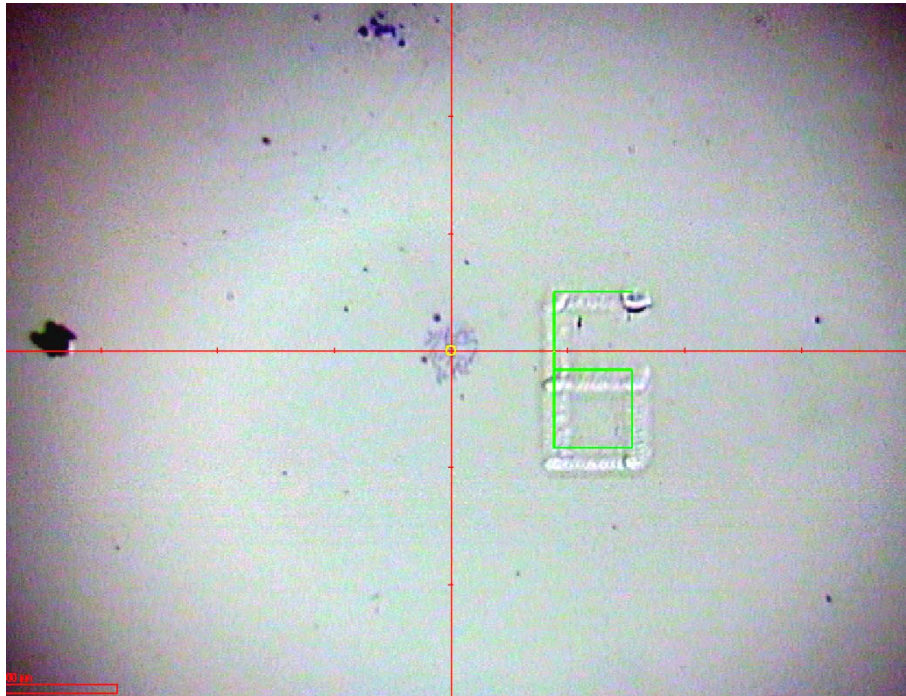


**Abb. 73:** Bild der einprogrammierten Positionen (grün) der zu untersuchenden CHO-Zellen vor der Ablation



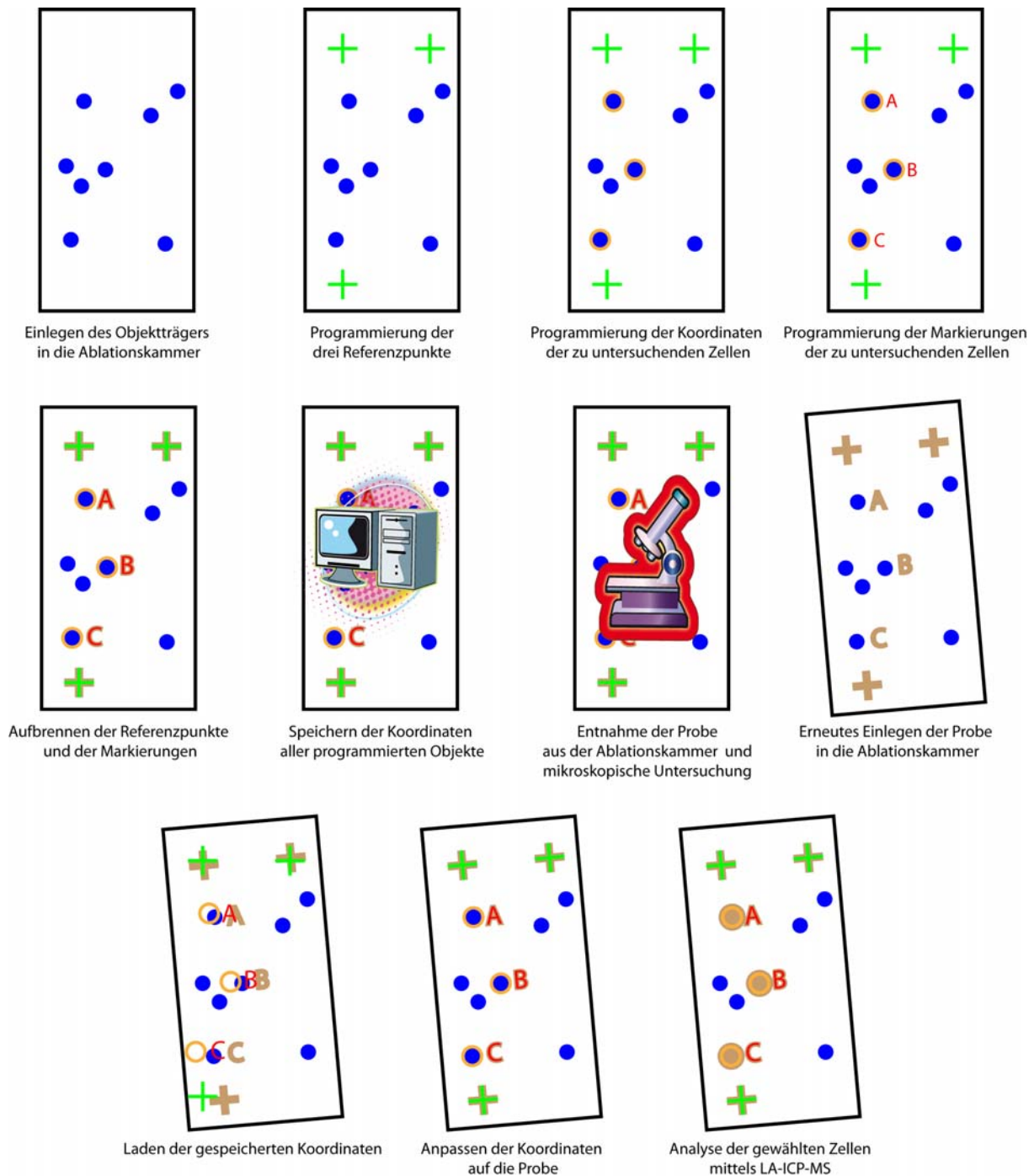
**Abb. 74:** Bild der einprogrammierten Positionen (grün) nach der Ablation

Sollen individuelle Zellen sowohl mittels Mikroskopie als auch mittels LA-ICP-MS untersucht werden, so muss diese Vorgehensweise modifiziert werden (Abb. 76). Die hierzu entwickelte Methode sieht vor, dass, bevor die Untersuchung mittels Mikroskop stattfindet, die zu untersuchenden Zellen in der LA-ICP-MS Apparatur durch eine lasererzeugte Markierung (zum Beispiel Zahlen oder Buchstaben) gekennzeichnet werden (Abb. 75). Die markierten Zellen können so sowohl unter dem Mikroskop als auch mit dem Laser-Ablationssystem wiedergefunden werden.



**Abb. 75:** Screenshot einer mit der Zahl 6 markierten Zelle mit programmierter Position (gelber Kreis im Fadenkreuz)

Nachdem die Koordinaten der zu untersuchenden Zellen programmiert sind, werden sie in eine Datei gespeichert, um später zur Untersuchung mittels LA-ICP-MS wieder geladen werden zu können. Anschließend erfolgen die Entnahme des Probenobjektträgers aus der Ablationskammer und dessen mikroskopische Untersuchung. Im Anschluss erfolgt ein erneutes Einlegen in die Ablationskammer zur abschließenden Analyse mittels LA-ICP-MS.



**Abb. 76: Verfahrensschema bei der sequentiellen Untersuchung selektierter Zellen mittels Mikroskop und LA-ICP-MS**

Da die exakte Positionierung der Probe bei wiederholtem Einlegen in die Ablationskammer nicht zuverlässig auf den Mikrometer genau wiederholt werden kann, die programmierten Positionen in der Datei jedoch in Bildschirm- und nicht in Probenkoordinaten angegeben sind, muss das Koordinatensystem der gespeicherten Positionen der Zellen auf die neue Probenausrichtung angepasst werden. Hierzu ist es notwendig bei der Markierung der Zellen auch drei (am besten

schon mit bloßem Auge sichtbare) wiederauffindbare Markierungen auf die Probe aufzubringen, diese als sog. Referenzpunkte zu programmieren und die exakte relative Position dieser Punkte zueinander zu kennen. Nach dem Wiedereinlegen der Probe in die Ablationskammer wird die Datei mit den gespeicherten Positionen geladen und die Referenzpunkte auf der Probe angesteuert, so dass mittels der Steuerungssoftware des Laser-Ablationssystems die geladenen Referenzpunktkoordinaten auf die tatsächlichen „rekoordiniert“ werden. Eine schematische Skizze des kompletten Vorgangs ist in Abb. 76 dargestellt.

Eine Kalibration ist wie im einschrittigen Verfahren extern, vor und nach der Analyse der Zellen möglich.

Das Verfahren klingt zunächst komplex, ist aber mit Routine schnell durchführbar. Der zeitintensivste Schritt ist neben der Analyse unter dem Mikroskop die Auswahl also das eigentliche Suchen geeigneter Zellen auf dem Bildschirm, da aus dem Bildausschnitt gerätebedingt nicht herausgezoomt werden kann.

Verbessern ließe sich die Methode durch Integration eines Mikroskops oder einer Optik mit entschieden verbesserter Vergrößerung direkt in die Software des Laser-Ablationssystems. Dies würde jedoch eine starke, kostenintensive Veränderung des Systems bedeuten.

Der allgemeine Vorteil der LA-ICP-MS-Analytik, dass es sich hierbei um eine quasi nicht destruktive Methode handelt, gilt nicht für die Untersuchung einzelner Zellen.

Für sie ist es komplett destruktiv, da die Zellen vollständig verdampft werden. Das hat den Nachteil, dass die Analyse einer einzelnen Zelle mittels LA-ICP-MS nicht wiederholt analysiert werden kann. Da jedoch im Allgemeinen eine große Anzahl an Zellen zur Verfügung steht, können die Ergebnisse dennoch auf eine genügend große Datenbasis gestellt werden.

#### **4.3.2 Entwicklung von Kalibrationstechniken zur Elementkonzentrationsbestimmung in einzelnen Zellen**

Will man über die rein qualitative Aussage, ob ein Element in einer Zelle vorkommt, hinaus den genauen Elementgehalt der Zelle bestimmen, ist eine Kalibration des LA-ICP-MS Systems notwendig. Der einfachste Ansatz zur Quantifizierung wäre die externe Kalibration mittels eines Standards bekannter Konzentration in den Zellen.

Diese Möglichkeit scheidet jedoch von vorne herein aus, da es unmöglich ist, Zellen mit beliebigen, exakten Konzentrationen verschiedener Elemente zu spiken. Allenfalls bei Einzelelementuntersuchungen des Phosphorgehalts wäre es vorstellbar durch die gezielte Verwendung mono-, di- und tetraploider Zellen (also einer definierten Vervielfachung des DNA-Gehalts und damit auch einer systematischen Erhöhung des Phosphorgehalts in einer Zelle) eine Kalibrationsmethode zu entwickeln.

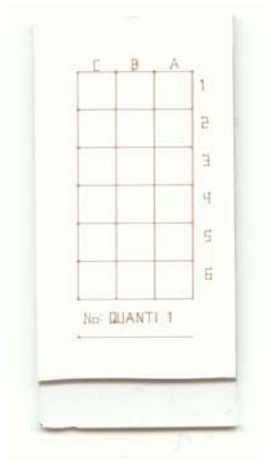
Um dennoch zu quantitativen Aussagen bei der Multielement-Untersuchung einzelner Zellen mittels LA-ICP-MS zu gelangen, sind daher zwei verschiedene Kalibrationsansätze entwickelt worden:

Zum einen kann eine Kalibration durch die vollständige Verdampfung einer flächig aufgetragenen definierten Menge Standards erreicht werden. Zum anderen kann kalibriert werden, indem ein bekanntes Volumen eines mit einer bekannten Elementkonzentration gespikten Gels abliert wird.

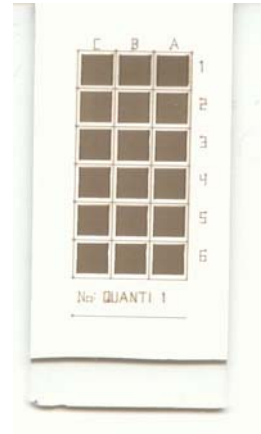
In beiden Methoden erfolgt die Kalibration über die Verwendung des Signalintegrals. Dies ist zum einen genauer als die Verwendung der reinen Signalthöhe und gerade im ersten Fall sogar zwingend erforderlich, da das Elementsignal auf einer Flächenverteilung basiert und keine Gauß-Funktion zugrunde liegt.

#### **4.3.2.1 Kalibrationstechnik mittels Ablation von aufgetropften Standards**

Zur Vorbereitung der Kalibration mittels Auftropfens wird auf den sauberen Objektträger zunächst durch den Laser ein Koordinatengitter aufgebrannt (siehe Abb. 77). Das Ablationsmuster hierzu ist auf dem Computer gespeichert und kann sofort nach dem Laden durch die Ablationssoftware auf das Glas aufgebrannt werden, so dass nach fünf Minuten der Kalibrationsobjektträger zum Auftragen des Standards bereit ist.



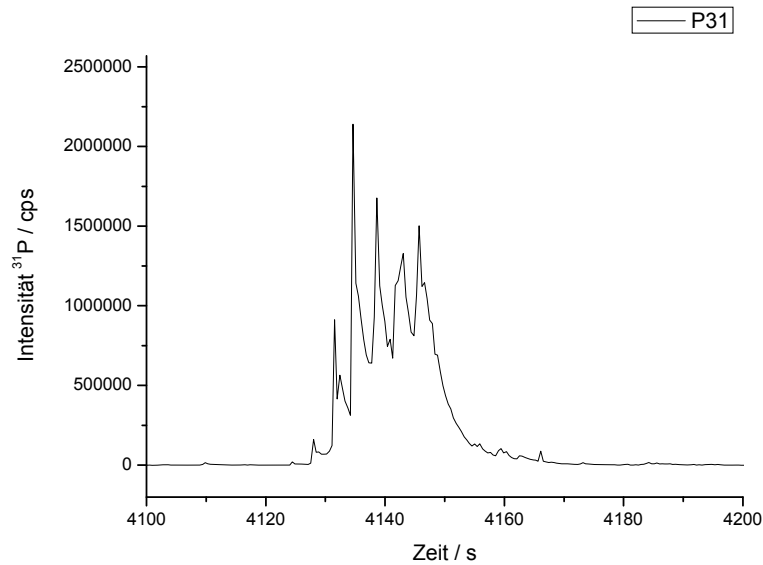
**Abb. 77: Kalibrationsmaster vor der Kalibrationsmessung**  
(Zur Visualisierung wurde hier statt reinem Glas ein mit einer PVDF-Membran bespannter Objektträger verwendet)



**Abb. 78: Kalibrationsmaster nach einer Kalibrationsmessung**

Im nächsten Schritt werden in die Koordinatenfelder kleine definierte Volumina von Standardlösungen (5  $\mu\text{L}$ ) aus einer Verdünnungsreihe aufgetragen, so dass jede Konzentration mindestens dreimal aufgetragen ist. In der obersten Reihe werden Blank-Lösungen aufgetragen. Anschließend lässt man den Kalibrationsobjektträger bei Raumtemperatur abgedeckt trocknen. Die auf diese Weise angefertigten Kalibrationsmaster sind, solange sie vor Staub und Verkratzen geschützt und waagrecht gelagert werden, beliebig lange haltbar außer bei flüchtige Standardsubstanzen wie zum Beispiel Quecksilber (Hg). In diesem Fall sollte nach dem Trocknen eine sofortige Analyse des Kalibrationsmasters erfolgen.

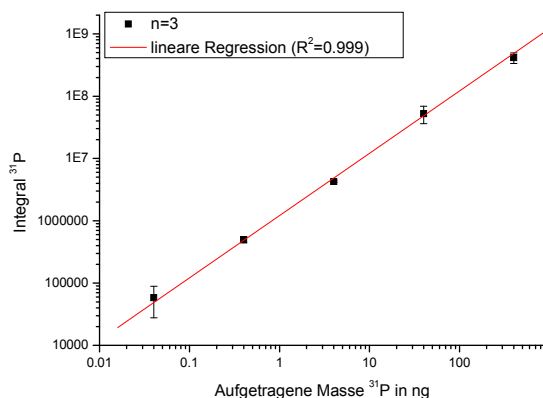
Zur eigentlichen Kalibration der LA-ICP-MS wird der Kalibrationsmaster in die Ablationskammer eingeführt, diese mit Trägergas gespült und das Analysenablationsmuster geladen. Dieses wird ähnlich wie bereits oben (Abb. 76, S. 146) beschrieben an die neue Lage des Masters angepasst. Anschließend werden die einzelnen Koordinatenfelder sequenziell zweimal lückenlos durch ein Raster aus parallelen, überlappenden Linienscans mittels LA-ICP-MS analysiert.



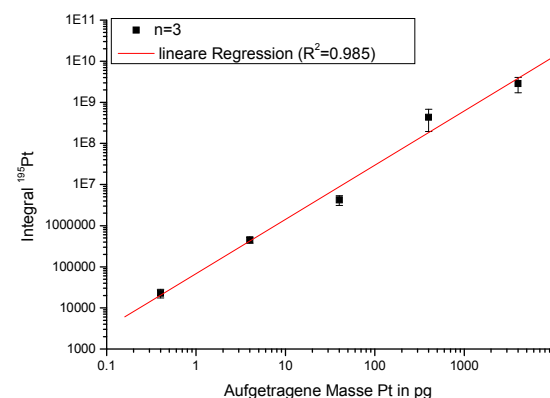
**Abb. 79:** Exemplarisches Elementsignal ( $^{31}\text{P}$ ) der Flächenablation eines Koordinatenfeldes des Ablationsmasters

Die Elementsignale des ICP-MS (Abb. 79) werden hintergrundbereinigt integriert sowie erstes und zweites Integral einer Fläche summiert.

Durch Korrelation der Integrale der jeweiligen Auftropfbereiche mit den aufgetragenen Massen wird eine Kalibration erreicht.



**Abb. 80:** Kalibrationsgerade der LA-ICP-MS für das Isotop  $^{31}\text{P}$  über fünf Größenordnungen mittels Auftropfmethode



**Abb. 81:** Kalibrationsgerade der LA-ICP-MS für das Isotop  $^{195}\text{Pt}$  über fünf Größenordnungen mittels Auftropfmethode

Die Nachweisgrenze ( $3\sigma$ ) des Kalibrationsverfahrens durch Auftropfen beträgt für  $^{31}\text{P}$  2,045 pg, für Platin auf Grund des geringeren Hintergrundniveaus lediglich 3,936 fg  $^{195}\text{Pt}$ .

Die Vorteile dieser Kalibrationsmethode bestehen in der einfachen Herstellung der Kalibrationsobjektträger, sowie in der großen Automatisierbarkeit der Kalibrationsmessungen, wenn ein vorgefertigter Objektträger mit graviertem Raster zur Lösungsauftragung verwendet wird. Nachteilig wirkt sich aus, dass durch die aufzutragenden kleinen Volumina von 5  $\mu\text{L}$  Pipettierfehler und Pipettenungenauigkeit relativ stark ins Gewicht fallen. Durch den Scan der verschiedenen Applikationsstellen muss eine insgesamt verhältnismäßig große Fläche zur Kalibration untersucht werden, so dass die Analysendauer des gesamten Kalibrationsobjektträgers rund ein bis zwei Stunden dauern kann.

Da bei der Kalibrationsmessung keine den Zellen ähnliche Matrix abliert wird, fehlt dieser Methode die Matrixanpassung, so dass sie auf systematische Fehler überprüft werden muss (vgl. Kapitel 4.3.2.3.2 auf S.157).

**Tabelle 42: Gegenüberstellung der Geräteparameter der LA-ICP-MS zur Kalibration durch aufgetropfte Standards und zur Einzelzellenuntersuchung**

	Kalibrationsmessung von aufgetropften Standards	Analyse der einzelner CHO-Zellen
ICP-MS RF-Power	1500 W	1500 W
ThO/Th	< 1%	< 1%
Elemente (Integrationszeiten)	$^{31}\text{P}$ (0,01s); $^{194}\text{Pt}$ (0,1s), $^{195}\text{Pt}$ (0,1s)	$^{31}\text{P}$ (0,01s); $^{194}\text{Pt}$ (0,1s), $^{195}\text{Pt}$ (0,1s)
Vorwärmphase	10 s	5 s
Auswaschverzögerung	25 s	25 s
Schussfrequenz	20 Hz	1 Hz
Analysendauer	< 9999 s	1 s
Analysenart	Überlappende Linienscans	Einzelschuss
Laserstrahldurchmesser	200 $\mu\text{m}$	50 $\mu\text{m}$
Linienabstand	150 $\mu\text{m}$	---
Scangeschwindigkeit	1000 $\mu\text{m/s}$	---
Energiedichte	1 J/cm <sup>2</sup>	1 J/cm <sup>2</sup>

Ein weiterer Nachteil der Methode besteht darin, dass für die Analyse des Kalibrationsobjektträgers andere Ablationsparameter genutzt werden (Tabelle 17), wie zum Beispiel ein anderer Laserstrahldurchmesser, eine andere Schussfrequenz



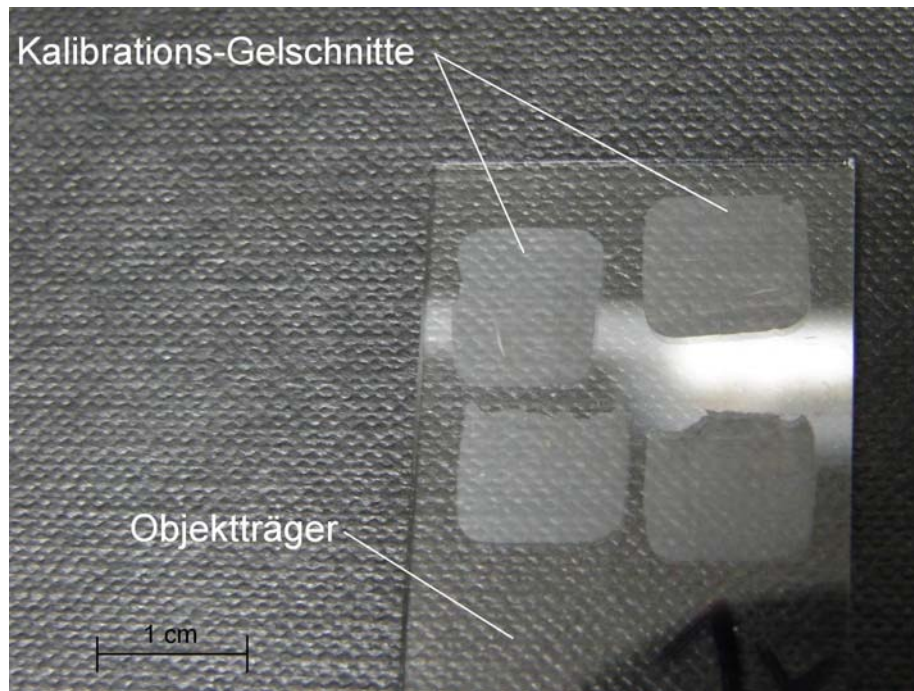
sowie die Verwendung von Linienscans gegenüber Einzelschüssen bei der Zelluntersuchung. Trotz Verwendung derselben eingestellten Energiedichte wie bei der Zelluntersuchung können daher Abweichungen im Ablationsaerosol auftreten. Eine Ursache hierfür liegt beispielsweise darin, dass durch eine hohe Schussfrequenz weniger Energie auf die Oberfläche übertragen werden kann, da eine partielle Absorption der Laserstrahlung durch das über dem Ablationsort stehende Aerosol des vorangegangenen Schusses stattfindet<sup>[58]</sup>. Dies führt zu einem anderen Ablationsverhalten und in Folge dessen zu einer anderen Plasmabeladung, so dass ein anderes Verhalten des Aerosols im Plasma des ICP-MS nicht ausgeschlossen werden kann. Die Verwendung gleicher Parameter ist theoretisch möglich, jedoch erhöht sich damit die Analysendauer des Kalibrationsobjektträgers drastisch und das Problem der mangelnden Matrixanpassung bleibt weiter bestehen.

#### **4.3.2.2 Kalibrationstechnik mittels synthetischer, matrixangepasster Standards**

Die zweite entwickelte Kalibrationstechnik ermöglicht die Kalibration bei denselben Laser-Ablationsparametern, wie sie zur Analyse der Zellen verwendet werden.

Hierzu werden Polyacrylamid-Gele mit definierten Konzentrationen (0,1 µg/g; 1 µg/g; 10 µg/g; 100 µg/g) der zu kalibrierenden Elemente gespikt. Dies geschieht schon vor der Polymerisation, so dass gewährleistet ist, dass die Konzentration homogen im ganzen Gel gleich ist. Die Kalibrationsmatrix kann als an die Analyse von Zellen angepasst gelten, da es sich ebenfalls um eine auf eine Glasoberfläche aufgetragene organische Matrix handelt. Beim Ansetzen der Gele wird insbesondere darauf geachtet, dass sie dieselben Hauptbestandteile (Wassergehalt, CHNO-Gehalt) wie durchschnittliches organisches Gewebe aufweisen.

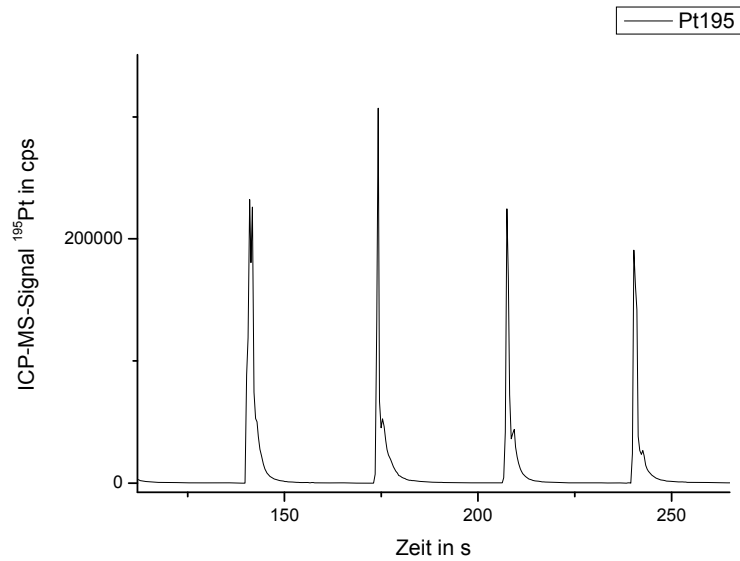
Die quaderförmigen Gele (10 mm x 10 mm x 5 mm) werden mittels eines durch flüssigen Stickstoff auf -195 °C gekühlten Aluminiumblocks schockgefroren. Die auf diese Weise hergestellten Gele werden mit Hilfe eines Kryomikrotoms in Scheiben definierter Dicke (10 µm) geschnitten (Abb. 82) und diese auf einen sauberen Objektträger aufgebracht. Anschließend werden die Schnitte wie die Zellen getrocknet und können zur Kalibrationsmessung verwendet werden.



**Abb. 82:** Bild eines Objektträgers mit Kalibrationsgelschnitt

Verwendet man ausschließlich nicht flüchtige Elemente zur Kalibration, so sind die Kalibrationsgelschnitte auf den Objektträgern, solange sie vor Kontaminationen und Verkratzen geschützt sind, theoretisch beliebig lange haltbar.

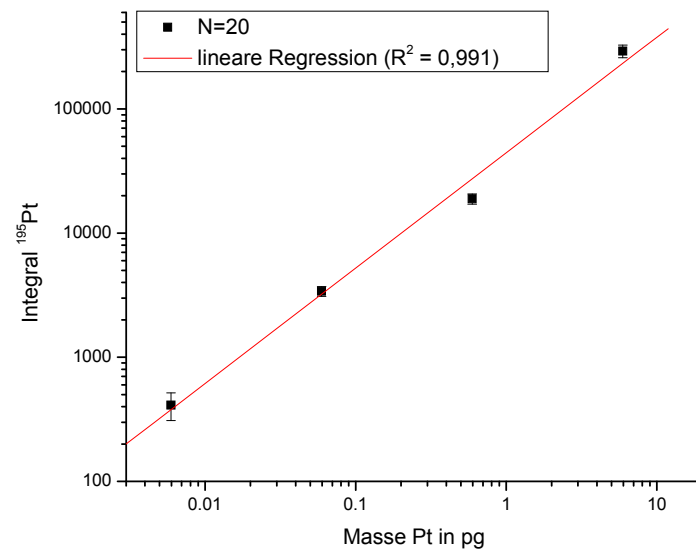
Die eigentlichen Kalibrationsmessungen erfolgen unter denselben Parametern wie die Zellanalyse. Es werden je Konzentrationsschritt und Gelschnitt 20 – 50 Einzelschüsse programmiert und analysiert.



**Abb. 83:**  $^{195}\text{Pt}$ -Signale der Analyse eines gespickten Kalibrationsgels mittels LA-ICP-MS

Durch den mittels einer 100-Mikrometerskala kalibrierten Bildschirm wird zum Schluss noch der genaue Durchmesser der Ablationskrater gemessen.

Aus der Dicke der Kryomikrotomschnitte und des Durchmessers des Ablationskraters wird nun das ablierte Volumen ermittelt und die Standardelementkonzentration im Gel in eine absolute Masse an Element pro Schuss umgerechnet. Diese kann durch Korrelation mit den Integralen der ICP-MS-Signale der Einzelschüsse aus den verschiedenen Kalibrationsgelschnitte zur Kalibration benutzt werden.



**Abb. 84: Kalibrationsgerade des Isotops  $^{195}\text{Pt}$  bestimmt durch LA-ICP-MS-Messungen von Kalibrationsgelschnitten**

Diese Kalibrationstechnik kann als matrixangepasst gelten, da sie die Matrix der Zellen im CHNO-Gehalt imitiert. Durch die Verwendung von rein synthetischen Komponenten hierzu ergibt sich für die meisten Elemente ein sehr geringer bis nicht mehr nachweisbarer Elementhintergrund, so dass nach einer Hintergrundkorrektur kalibriert werden kann und nicht mehr auf das Verfahren der Standardaddition zurückgegriffen werden muss. Dies führt im Falle von Platin ( $^{195}\text{Pt}$ ) zu Nachweisgrenzen ( $3\sigma$ ) von 0,331 fg und im Falle von Phosphor ( $^{31}\text{P}$ ) von 71,4 fg.

Die Kalibration erfolgt hierbei mit denselben Analysenparametern wie die eigentliche Untersuchung der Zellen, so dass vergleichbare Analysenbedingungen herrschen, auch das ein Vorteil. Durch die relativ große, homogene Fläche eines Kalibrationsgelschnittes können fast beliebig viele Einzelschüsse zur Kalibration genutzt werden, um so die Kalibration auf eine große Datenbasis zu stellen.

Einzigster Nachteil dieser Methode ist es, dass zwar zertifizierte Elementstandardlösungen zum Ansatz der Kalibrationsgele verwendet werden, eine weitere direkte Validierung jedoch auf Grund von mangelnden geeigneten Standardreferenzmaterialien nicht ohne weiteres möglich ist.

### 4.3.2.3 Vergleich der beiden Kalibrationsmethoden

#### 4.3.2.3.1 Vergleich der analytischen Eckdaten beider Methoden

Beide Kalibrationsmethoden zeigen eine lineare Abhängigkeit der Analytmasse mit dem Elementsignal auf. Die Kalibrationsstrategie mittels Auftropfens hat einen dynamischen Bereich von mehr als fünf Größenordnungen, der vom oberen Femtogrammbereich ( $10^{-13}$  g) bis in den Nanogrammbereich ( $10^{-9}$  g) reicht. Limitationen nach unten ergeben sich bei einigen Elementen, wie beispielsweise Phosphor, durch einen Elementhintergrund bei anderen nur durch die Sensitivität (Detektorrauschen). Nach oben hin wird die Grenze durch nicht mehr vollständige Ablation des aufgetragenen Materials bestimmt.

Bei der Matrix- und Laserparameter angepassten Kalibrationsstrategie mittels Gelschnitten beträgt der dynamische Bereich mindestens vier Größenordnungen. Begrenzt ist er nach unten wie die andere Methode nur durch die Sensitivität und den Hintergrund. Die obere Grenze der Kalibration ist hier jedoch durch den Elementgehalt im Gel gegeben. Bei sehr hohen Konzentrationen ( $>100 \mu\text{g/g}$ ) kann es vorkommen, dass die Polymerisation des Gels gestört wird, so dass es nicht mehr möglich ist, Schnitte des Gels in definierten Dicken anzufertigen. Insgesamt liegen die Nachweisgrenzen der „Gelmethode“ um rund 1,5 Größenordnungen unter denen der „Auftropfmethode“. Dies liegt darin begründet, dass bei der Gelmethode eine wesentlich kleinere Fläche (beispielsweise  $0,008 \text{ mm}^2$ ) untersucht werden muss als bei der Auftropfmethode (ca.  $15 \text{ mm}^2$ ). Würde eine Masse in der Nähe der Nachweisgrenze der Gelmethode auf eine Fläche verteilt, wie sie die Auftropfmethode untersucht, so würde sie nicht mehr registriert werden können.

**Tabelle 43: Eckdaten der beiden Kalibrationsmethoden**

	<b>Auftropfmethode</b>	<b>Gelmethode</b>
Matrix	unangepasst	angepasst
Ablationsparameter der Zellanalyse und der Kalibrationsmessung	verschieden	identisch
Nachweisgrenze $^{31}\text{P}$	2,045 pg	0,0714 pg
Nachweisgrenze $^{195}\text{Pt}$	3,936 fg	0,331 fg
Dynamischer Bereich	$>5$ Größenordnungen	$>4$ Größenordnungen

#### **4.3.2.3.2 Überprüfung der Richtigkeit der Kalibration der beiden Methoden**

Auf Grund mangelnder Verfügbarkeit geeigneter Standards kann die Überprüfung der Richtigkeit beider Methoden nicht mit zertifizierten Standardreferenzmaterialien erfolgen. Eine Untersuchung der Kalibrationsergebnisse erfolgt deshalb auf einer anderen, eher ungewöhnlichen Art.

Die Länge (Anzahl an Basenpaaren) der DNA von Säugerzellen ist für viele Tiere bekannt. So auch für die hier untersuchten CHO-Zellen des chinesischen Hamsters (*Cricetulus griseus*).

Die Literatur spricht von  $2,98 \cdot 10^9 \pm 0,48 \cdot 10^9$  Basenpaaren der DNA eines chinesischen Hamsters<sup>[129-133]</sup>.

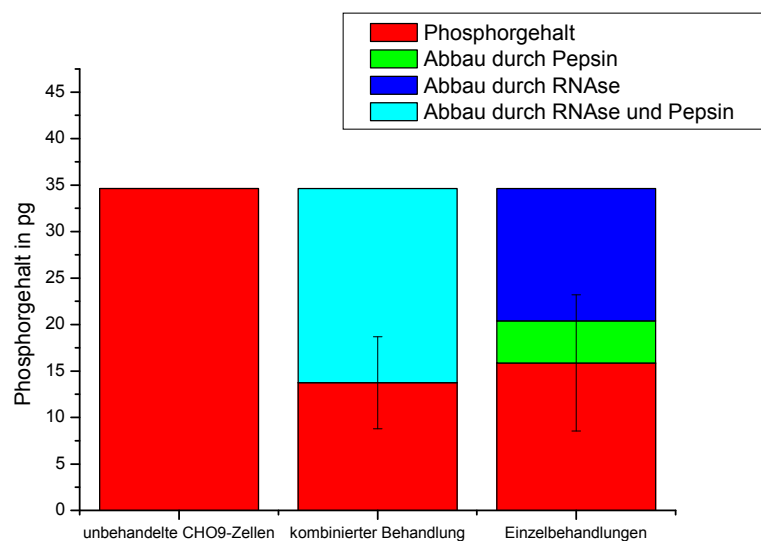
Durch eine biologische Zellpräparationsmethode (siehe Methodenteil Kapitel 3.5.11.3, S. 75) ist es möglich, Schritt für Schritt sämtliche Phosphorquellen außer der DNA aus einer Zelle zu eliminieren.

Dazu wird die Zelle zuerst mittels eines hypotonen Schocks zum Platzen gebracht und die Zellmembranfragmente mittels Aceton fortgespült, so dass im weiteren Verlauf Chemikalien in sie eindringen können. Anschließend werden die Zellen mit RNase behandelt. Dadurch wird die RNA der Zelle verdaut und kann als Lösung kleiner Fragmente aus der Zelle ausgespült werden. Durch die Zugabe von Pepsin werden nun die Proteine verdaut und ebenfalls ausgespült. Somit sind alle Quellen für Phosphor in einer Zelle außer der DNA ausgeschlossen.

Berechnet man an Hand der Anzahl der Basenpaare von  $2,98 \cdot 10^9$  die Menge an Phosphor einer diploiden Zelle in der G1-Phase, so erhält man eine Masse von 0,61 pg Phosphor. Da im Zellzyklus in der S-Phase die Menge der DNA verdoppelt wird und in der anschließenden G2-Phase somit die doppelte Menge vorliegt, kann unter Berücksichtigung der jeweiligen Längen der Phasen<sup>[13]</sup>, die zu erwartende durchschnittliche Menge an Phosphor in der DNA einer nicht synchronisierten CHO-Zelle in der Interphase berechnet werden (siehe Anhang Kapitel 11.7, S.227). Es ergibt sich eine durchschnittliche Masse an Phosphor von 0,89 pg pro Zelle.

Durch die Untersuchung des Phosphorgehalts einer solchen Zelle kann bei bekannter Länge der DNA durch Vergleich der Ergebnisse mit dem Erwartungswert nun darauf geschlossen werden, ob die Kalibrationsmethode valide Ergebnisse liefert.

Die Untersuchung der Pepsin und/oder RNase behandelten CHO-Zellen brachten für die Kalibrationsmethode mittels Auftropfens Ergebnisse, die in Tabelle 44 zu sehen sind. Der Phosphorgehalt der unbehandelten CHO-Zellen ist mit 34,6 pg am höchsten, eine Pepsin Behandlung brachte eine Reduktion um ca. 4,5 pg. Deutlich stärker wirkte sich eine RNase-Behandlung der Zellen aus, der Phosphorgehalt sinkt hierbei um 14,3 pg. Bei der kombinierten Behandlung sowohl mit RNase wie auch mit Pepsin wird eine Reduktion des Phosphorgehalts um 20,3 pg erreicht, was sehr gut mit der Summe der beiden Behandlungseffekte korreliert (Abb. 85).



**Abb. 85: Vergleich des Phosphorabbaus in CHO-Zellen durch summierte und kombinierte RNase und Pepsinbehandlung nach Kalibration mittels Auftropfmethode**

**Tabelle 44: Phosphorgehalt behandelter CHO-Zellen nach Kalibration mittels Auftropfmethode**

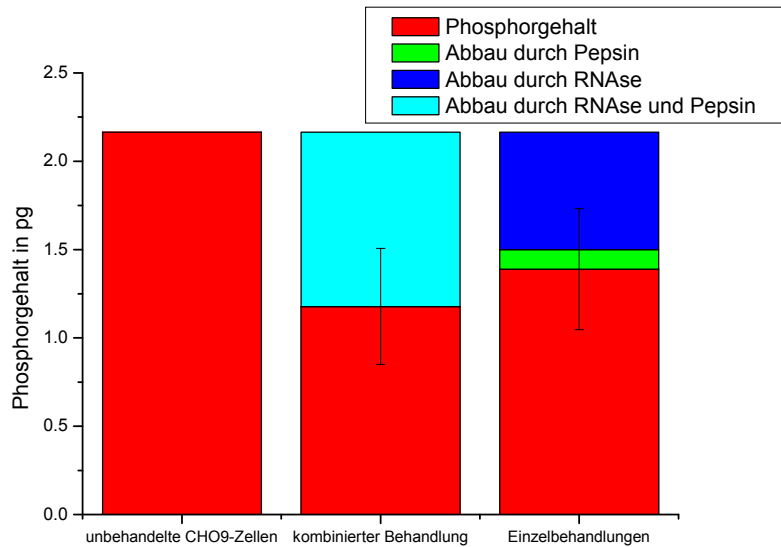
<u>Auftropfmethode</u>	Masse <sup>31</sup> P in pg	Standardabw.	Rel. Fehler
Unbehandelte CHO-Zellen	34,63	9,76	28,2%
Nach RNase-Behandlung	20,39	7,33	36,0%
Nach Pepsin-Behandlung	30,12	15,55	51,6%
Nach Pepsin- und RNase-Behandlung	13,74	4,94	36,0%

Allerdings liegt der gefundene Wert von Phosphor mit 13,7 pg ± 4,9 pg für diese Kalibrationstechnik mehr als eine Größenordnung über dem Erwartungswert von 0,89 pg. Da jedoch die relativen, gefundenen Werte der Untersuchung der Zellen

sehr wohl einen Sinn ergeben, wird davon ausgegangen, dass es sich um einen systematischen Fehler handelt. Dieser wird vermutlich verursacht durch die Verwendung unterschiedlicher Ablationsparameter zwischen den Kalibrationsmessungen und den Untersuchungsmessungen der CHO-Zellen mittels LA-ICP-MS sowie mangelnder Matrixanpassung der Kalibrationsmethode.

Die Ergebnisse der matrixangepassten, externen Kalibrationsmethode durch Gelschnitte liefern für CHO-Zellen rein relativ betrachtet sehr ähnliche Ergebnisse. Der Phosphorgehalt der unbehandelten Zellen ist am höchsten, eine Pepsin-Behandlung führt zu einer geringfügigen nicht signifikanten Abnahme, wohingegen sich eine Behandlung mit RNase deutlich im Phosphorgehalt niederschlägt. Bei der kombinierten sequentiellen Behandlung mit Nuklease und Protease erhält man eine Abnahme im Phosphorgehalt, die, wie bereits mit der Auftropfmethode festgestellt, dem summierten Effekt der Einzelbehandlungen entspricht. Die noch gefundene Masse an Phosphor entspricht für die Kalibrationsmethode durch matrixangepasste Gelschnitte  $1,18 \text{ pg} \pm 0,321 \text{ pg}$ . Das entspricht im Rahmen der Standardabweichung dem Erwartungswert von  $0,89 \pm 0,14 \text{ pg}$ , so dass von einer Übereinstimmung der gefundenen Werte mit dem tatsächlichen Gehalt ausgegangen werden kann. Das gegenüber dem Erwartungswert leicht erhöhte Ergebnis deutet möglicherweise darauf hin, dass die Zellmembran nicht vollständig durch die Acetonbehandlung entfernt werden konnte. Wobei die abgeschätzte Masse an Phosphor, die aus der Zellmembran stammen kann, allerdings nur maximal ca.  $0,20 \text{ pg}$  ausmachen kann (siehe Anhang S.228).





**Abb. 86: Vergleich des Phosphorabbaus in CHO-Zellen durch summierte und kombinierte RNase und Pepsinbehandlung nach Kalibration mittels Gelschnittmethode**

**Tabelle 45: Phosphorgehalt behandelter CHO-Zellen nach Kalibration mittels Gelschnittmethode**

<u>Kalibrationsgelschnitte</u>	Masse $^{31}\text{P}$ in pg	Standardabw.	Rel. Fehler
Unbehandelte CHO-Zellen	2,165	0,676	31,2%
Nach Pepsin-Behandlung	2,055	0,370	18,0%
Nach RNase-Behandlung	1,499	0,342	22,8%
Nach Pepsin- und RNase-Behandlung	1,178	0,328	27,8%

Alles in allem kann davon ausgegangen werden, dass durch die oben vorgestellte Überprüfungsmethode die Richtigkeit der Kalibrationstechniken und somit die Validität der Ergebnisse bestimmt werden kann.

Da die übliche Methode zur Überprüfung der Richtigkeit der Analysenergebnisse durch die Verwendung von geeigneten, zertifizierten Standardreferenzmaterialien im Moment auf Grund mangelnder Standards nicht verfügbar ist, muss eine genauere Validierung nach einem Standardverfahren in die Zukunft verschoben werden.

Der Vergleich der beiden Kalibrationstechniken zeigt, dass beide Techniken relativ betrachtet dieselben Ergebnisse liefern. Jedoch tritt bei der Auftropfmethode ein großer systematischer Fehler auf, so dass deren Ergebnisse nicht valide sind. Dies

liegt vermutlich an mangelnder Matrixanpassung und in den unterschiedlichen Analyse- und Kalibrationsparametern der LA-ICP-MS begründet.

Bei dem Kalibrationsverfahren mittels Gelschnitten kann bei identischen Analysen- und Kalibrationsparametern der Erwartungswert an Phosphor für eine RNase und Pepsin gehandelte CHO-Zelle wiedergefunden werden, so dass die Ergebnisse als valide betrachtet werden können. Außerdem kann mittels dieser Kalibrationstechnik weit empfindlicher kalibriert und quantifiziert werden.

Mit der Kalibrationstechnik über matrixangepasste Polyacrylamid-Gelschnitte steht also eine sowohl in der Herstellung der Standards wie auch in der Anwendung einfache Methode zur Verfügung. Die hergestellten Standards sind absolut homogen, da die Kalibrationsproben bereits vor der Polymerisation im flüssigen Zustand gespikt werden. Die Methode ist multielementfähig, kann über einen großen Konzentrationsbereich angewandt werden und die Messung der Kalibrationsproben geschieht mit denselben Parametern wie bei der Analyse der Zellen. Es sind also alle notwendigen Faktoren erfüllt, die ein Kalibrationsverfahren erfüllen muss<sup>[9]</sup>.

#### **4.3.3 Untersuchung von cis-Platin inkubierten CHO-Zellen mittels LA-ICP-MS**

Das oft in der Krebstherapie eingesetzte Zytostatikum cis-Platin erzielt bei Zellen zwei gewünschte Effekte: den Zellzyklusarrest und die Induktion der Apoptose geschädigter Zellen. cis-Platin besitzt jedoch zusätzlich eine starke mutagene Wirkung, die unter anderem zur Ausbildung von Chromosomenaberrationen führt.

Zur Untersuchung der Fragestellung wieviel cis-Platin bei CHO-Zellen welche Anzahl und welche Typen von Chromosomenaberrationen hervorbringt, muss zunächst die aufgenommene Gesamtmenge an cis-Platin pro Zelle ermittelt werden. Da Chromosomenaberrationen nur durch an der DNA komplexiertes cis-Platin während des Replikationsprozesses entstehen, muss der Platingehalt pro Zelle anschließend weiter aufgeschlüsselt werden, um herauszufinden, wo genau sich das cis-Platin in der Zelle befindet. Um zu einer Aussage über die Anzahl und die Arten der erzeugten Chromosomenaberrationen zu gelangen, werden CHO-Zellen, die sich in der Metaphase befinden, lichtmikroskopisch untersucht.

#### 4.3.3.1 Bestimmung des Phosphor- und Platingehalts cis-Platin behandelter CHO-Zellen

Zur Untersuchung der Aufnahme von cis-Platin durch CHO-Zellen wird bei einer Zelldichte der Kultur von  $10^5$  Zellen pro Petrischale (10cm Durchmesser) das Nährmedium durch Zugabe kleiner Volumina einer 16,6 mM Lösung von cis-Platin in DMSO mit verschiedenen Konzentrationen (4,15  $\mu$ M; 8,30  $\mu$ M; 12,45  $\mu$ M; 16,6 $\mu$ M) gespikt. Nach einer Inkubationsdauer von 1 h wird das gespikte Nährmedium verworfen, mehrmals gründlich mit frischem ungespikten Medium gespült und anschließend 24 h weiterkultiviert. Nach dem Auftropfen der Zellen auf einen gereinigten Objektträger (2,5 cm x 5 cm) und GIEMSA-Färbung werden die getrockneten Zellen mittels des kalibrierten LA-ICP-MS auf ihre Konzentrationen an Platin und Phosphor untersucht.

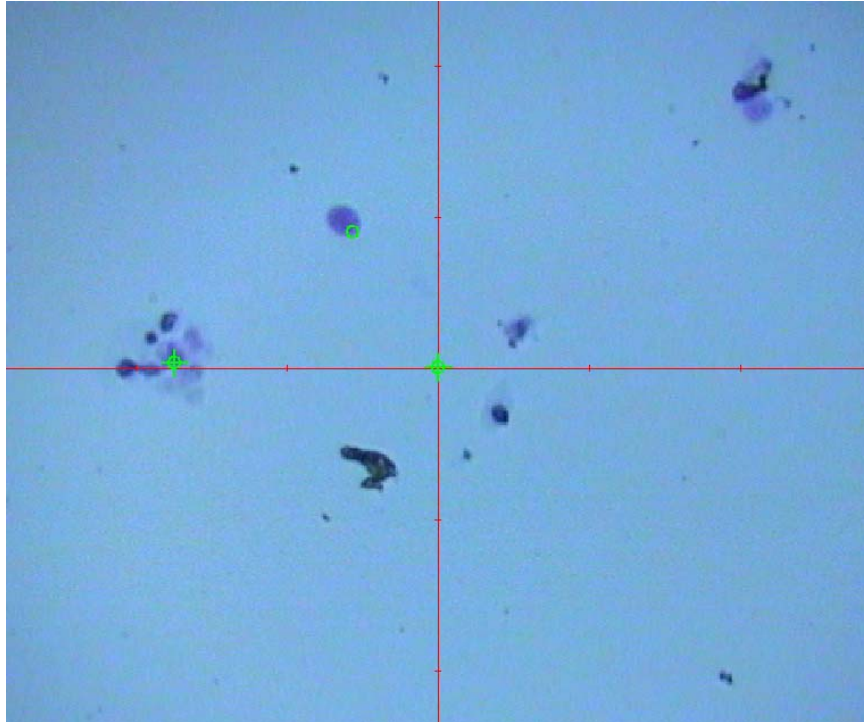
Zu allen drei untersuchten Spikekonzentrationen (4,15  $\mu$ M; 8,3  $\mu$ M; 12,45  $\mu$ M cis-Pt) wurden je 25 CHO-Zellen untersucht und über deren Ergebnisse jeweils gemittelt. Die Analyse der Phosphorgehalte lieferte über alle drei Messungen einen Mittelwert von 2,139 pg P. Dies entspricht fast exakt dem bereits zuvor in Kapitel 4.3.2.3.2, S. 157 gefundenen Wert für CHO-Zellen von  $2,165 \pm 0,676$  pg P. Die im Einzelnen gefundenen Abweichungen von diesem Wert liegen alle im Rahmen der Fehlertoleranz. Für eine Spikekonzentration von 4,15  $\mu$ M cis-Platin liegt die Menge an gefundenem Platin unterhalb der Nachweisgrenze. Für 8,30  $\mu$ M gespikten und 12,45  $\mu$ M gespikten Zellen steigt der Platingehalt der Zellen deutlich von 0,755 fg bis auf 1,464 fg an. Es lässt sich also eine Abhängigkeit der gefundenen Platinmengen der CHO-Zellen von den Spikekonzentrationen finden (Tabelle 46).

**Tabelle 46: Phosphor- und Platingehalt der cis-Pt inkubierten CHO-Zellen**

jeweils N=25	Masse P pro Zelle in pg	Masse Pt pro Zelle in fg
CHO 1h inkubiert mit 4,15 $\mu$ M cis-Platin	$2,012 \pm 0,672$	n. n.
CHO 1h inkubiert mit 8,30 $\mu$ M cis-Platin	$1,771 \pm 0,770$	$0,755 \pm 0,223$
CHO 1h inkubiert mit 12,45 $\mu$ M cis-Platin	$2,634 \pm 0,744$	$1,464 \pm 0,339$
Mittelwert P	2,139	

Eine cis-Platin Spikekonzentrationen  $\geq 16,6$   $\mu$ M ist für einen Großteil der CHO-Zellen entweder akut letal oder führt zu der bekannten Wirkung der Induktion der Apoptose

(programmierter Zelltod)<sup>[14]</sup>, so dass nach 24 h Kultivierung nach dem 1 h Spike kaum noch Zellen überlebt haben und fast nur noch Zelltrümmer unter dem Mikroskop sichtbar sind (vgl. Abb. 87).



**Abb. 87:** Mit 16,6  $\mu\text{M}$  cis-Pt inkubierte CHO-Zellen nach 24 h Kultivierung: Es sind kaum noch intakte Zellen sichtbar, meist nur noch Zelltrümmer

Aus der Literatur ist ein aktiver Transport des cis-Platins in Säugerzellen bekannt<sup>[146]</sup>. Ebenfalls bekannt ist, dass es Komplexe mit der DNA eingeht<sup>[15,139]</sup>. Die Frage, ob das cis-Platin quantitativ an die DNA bindet oder noch an anderen Fraktionen einer Zelle, wird in einer weiteren Versuchsreihe im folgenden Kapitel geklärt.

#### **4.3.3.2 Untersuchung des Bindungs- und Aufnahmeverhaltens von cis-Platin in CHO-Zellen**

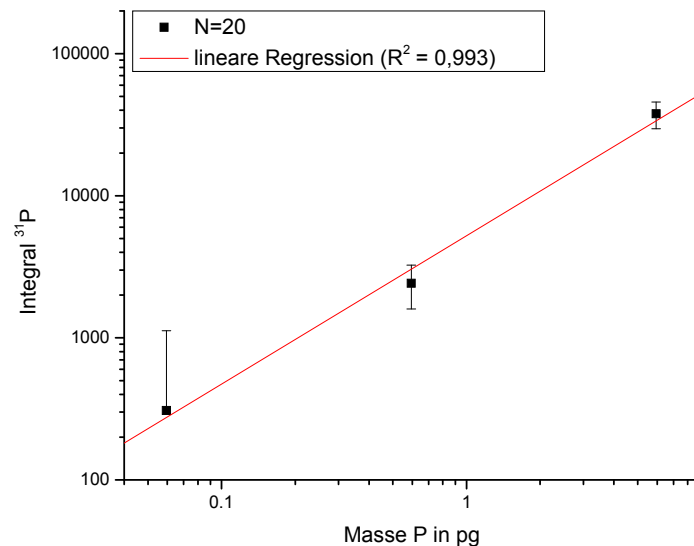
An welcher Fraktion (Proteine, DNA oder RNA) das cis-Platin neben der Komplexierung durch die DNA noch bindet, wird untersucht, indem zunächst mittels hypotonem Schock aufgeplatzte Zellen mit verschiedenen Reagenzien behandelt werden, um einzelne Fraktionen zu eliminieren. Anschließend werden die Abbauprodukte gründlich fortgespült und die Zellen können per LA-ICP-MS auf den verbliebenen Gehalt untersucht werden.

Zur Elimination der Proteinfraction werden die Zellen mit Pepsin behandelt, das alle Proteine, sowohl in der Zelle als auch aus der Zellwand ragende, verdaut. Die Entfernung der RNA-Fraktion wird durch die Behandlung mit RNase erreicht. Beide Verfahren können sequenziell durchgeführt werden. Um dabei einen Verdau der RNase durch Restpepsin zu verhindern, muss die RNase-Behandlung vor der Pepsinbehandlung erfolgen. Nach der Doppelbehandlung bleibt nur noch die DNA-Fraktion in der Zelle erhalten.

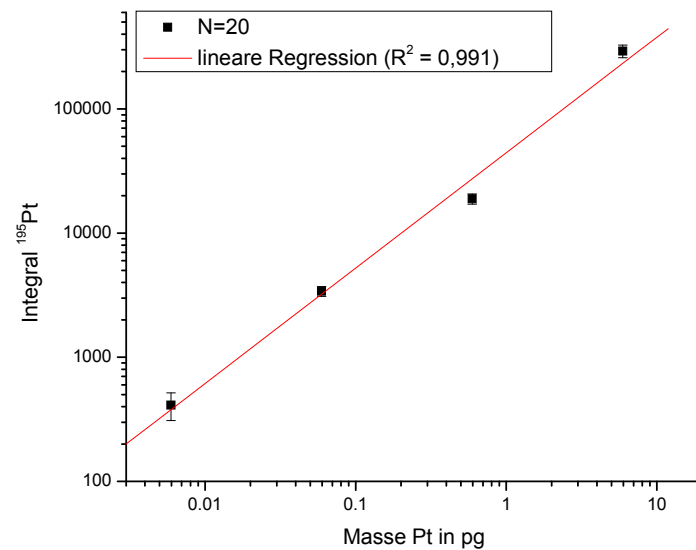
Durch die Analyse der Zelle mittels LA-ICP-MS kann nun durch parallele Aufnahme des Phosphor- und des Plattingehalts nachgewiesen werden, an welche Fraktion (Proteine, RNA oder DNA) das cis-Platin gebunden ist.

Zur quantitativen Bestimmung erfolgt eine Kalibration des LA-ICP-MS-Systems mittels gespikter, matrixangepasster Kalibrationsgelschnitte für die Elemente Phosphor (m/z 31) und Platin (m/z 195).

Abb. 88 und Abb. 89 zeigen die jeweiligen Kalibrationsgeraden.



**Abb. 88:** Kalibrationsgerade des LA-ICP-MS-Systems für  $^{31}\text{P}$  mittels Gelschnittmethode



**Abb. 89: Kalibrationsgerade des LA-ICP-MS-Systems für <sup>195</sup>Pt mittels Gelschnittmethode**

Die Untersuchung der Veränderung des Phosphorgehalts gegenüber den nicht behandelten Zellen dient nach der bereits oben (Kapitel 4.3.2.3.2, S. 157) beschriebenen Absicherung der Richtigkeit der Analysenergebnisse als Kontrolle, ob das Zellinnere durch einen hypotonen Schock für die Reagenzien zugänglich gemacht werden kann.

Aus den Ergebnissen (Tabelle 47) geht hervor, dass sich der Gehalt der Zellen an Phosphor durch die Behandlung mit RNase oder/und Pepsin schrittweise verringert. Die RNase-Behandlung ist hierbei eindeutig für den Großteil der Reduktion des Phosphorgehalts verantwortlich.

**Tabelle 47: Phosphorgehalt der mit 12,45  $\mu$ M cis-Pt inkubierten CHO-Zellen**

Jeweils N = 25	Masse P pro Zelle in pg	Stoffmenge P in pmol
CHO mit cis-Pt inkubiert	2,165 $\pm$ 0,676	0,0699 $\pm$ 0,0218
CHO mit cis-Pt inkubiert, Pepsin behandelt	2,055 $\pm$ 0,370	0,0663 $\pm$ 0,0119
CHO mit cis-Pt inkubiert, RNase behandelt	1,499 $\pm$ 0,342	0,0484 $\pm$ 0,0110
CHO mit cis-Pt inkubiert, RNase und Pepsin behandelt	1,178 $\pm$ 0,328	0,0380 $\pm$ 0,0106

Die Reduktion des Phosphoranteils durch Pepsin allein ist nicht signifikant, da der gefundene Anteil der Phosphorabnahme kleiner als die Standardabweichung der Messwerte ist. Da jedoch bei sequenzieller Behandlung mit RNase und Pepsin reproduzierbar ein größerer Verlust an Phosphor festzustellen ist als bei der reinen RNase-Behandlung, lässt sich die Wirkung von Pepsin beweisen.

Der größere Einfluss der RNase-Behandlung auf die Veränderung des Phosphorgehalts kann durch zwei Dinge erklärt werden. Zum einen besitzt RNA einen hohen Phosphorgehalt (ein Phosphatrest pro Nukleotid)<sup>[126,127,167]</sup>, zum anderen ist der Phosphorylierungsgrad eines Phosphoproteins auf wenige phosphorylierte Aminosäuren beschränkt<sup>[168]</sup>.

Es ist somit eindeutig bewiesen, dass das Zellinnere durch hypotone Schocks zugänglich gemacht wird. Die Behandlung der CHO-Zellen mit Enzymen (Nuklease und Protease) ist erfolgreich und die RNA- und/oder Proteinfraction können durch Ausspülen ihrer verdauten Fragmente entfernt werden.

Um zu ermitteln an welcher Fraktion (Proteine, RNA oder DNA) das cis-Platin bindet, findet parallel zur Untersuchung der CHO-Zellen auf Phosphor deren Analyse auf Platin statt.

Der gefundene Platingehalt der 1 h mittels 12,45 µM cis-Platin inkubierten CHO-Zellen vor und nach verschiedenen Enzym-Behandlungen, bleibt im Rahmen der Standardabweichung konstant bei etwa 1,11 fg Platin pro CHO-Zelle (siehe Tabelle 48). Dies entspricht einer durchschnittlichen cis-Platin-Stoffmenge von 5,64 amol.

**Tabelle 48: Platingehalt der mit 12,45 µM cis-Pt inkubierten CHO-Zellen**

Jeweils N = 25	Masse Pt pro Zelle in fg	Stoffmenge cis- Pt in amol
CHO mit cis-Pt inkubiert	1,124 ± 0,321	5,762 ± 1,645
CHO mit cis-Pt inkubiert, Pepsin behandelt	1,048 ± 0,260	5,372 ± 1,333
CHO mit cis-Pt inkubiert, RNase behandelt	1,229 ± 0,359	6,300 ± 1,840
CHO mit cis-Pt inkubiert, RNase und Pepsin behandelt	1,043 ± 0,345	5,346 ± 1,768

Das bedeutet, dass das Platin auch nach Entfernung der Protein- und RNA-Fraktion weiterhin in der Zelle verweilt. Erklären lässt sich dies nur durch eine starke

Komplexierung des cis-Platins durch die DNA, die noch in der Zelle verblieben ist und wie aus der Literatur<sup>[14]</sup> bekannt als Chelatligand fungiert.

Zwar kann mit dieser Technik nicht abschließend geklärt werden, ob die RNA- und Protein-Fraktion wirklich vollständig aus den Zellen eliminiert wurden, da der Platingehalt aber im Gegensatz zum Phosphorgehalt als über die Behandlungen konstant gefunden wurde, kommt dieser Frage für die hier gefundene Aussage der Bindung des cis-Platins an die DNA keine weitere Bedeutung zu.

Die vorliegenden Ergebnisse können die bereits aus der Literatur bekannte, durch molekularbiologische Methoden gefundene Aussage bestätigen, dass die DNA das primäre Bindungsziel von cis-Platin in einer Zelle ist<sup>[139]</sup>, und für den speziellen Fall der 1 h mittels 12,45  $\mu\text{M}$  cis-Platin inkubierten CHO-Zellen durch eine quantitative Aussage der Aufnahme von 5,64 amol (= 1,11 fg Platin) cis-Platin erweitern.

Um eine Aussage über die Aufnahme- und Eliminationsgeschwindigkeiten durch die Zellmembran treffen zu können, könnte in der Zukunft eine Versuchsreihe von Zellen mit unterschiedlich langen Inkubations- und anschließenden Kultivierungszeiten untersucht werden.

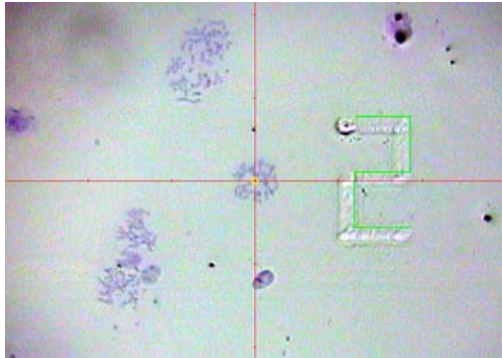
#### **4.3.3.3 Sequenzielle Untersuchung von Metaphasen in CHO-Zellen mittels optischer Mikroskopie und LA-ICP-MS**

Zur Untersuchung von CHO-Zellen, die sich in der Metaphase befinden, wird 2 h vor der Präparation Colcemid zum Nährmedium zugegeben. Dieses bewirkt, dass der Zellzyklus der Zelle im Stadium der Metaphase angehalten wird, da die Mikrotubuli, welche die verdoppelten Chromosomen zur Teilung des Zellkerns voneinander wegziehen sollen, aufgelöst werden. Die auf diese Weise gewonnen Metaphasen nennt man C-Metaphasen (engl.: colcemid-blocked metaphase). Sie unterscheiden sich optisch von normalen Metaphasen dadurch, dass die Cohesin-Ringe, die die Schwesterchromatide der Chromosomen aneinander binden, bereits wie sonst erst in der Anaphase stattfindend aufgelöst wurden und die Chromosomen in der allgemein bekannten X-Form zu sehen sind.

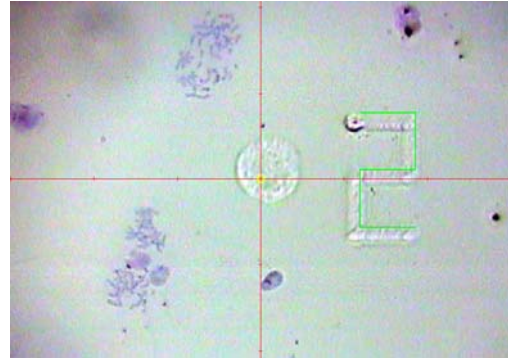
Durch Anwendung dieser Methode wird gewährleistet, dass eine genügend hohe Anzahl an Zellen im Stadium der ansonsten jeweils nur wenige Minuten dauernden Metaphase untersucht werden kann und dass sich die Chromosomen örtlich ein



wenig verteilen, und nicht mehr übereinander liegen. Außerdem können die einzelnen Chromosomen einer C-Metaphase im Gegensatz zu denen normaler Metaphasen besser optisch auf Chromosomenabberationen untersucht werden.



**Abb. 90: Mittels Laser-Ablation beschriftete Metaphase-Zelle zur licht-mikroskopischen Analyse**



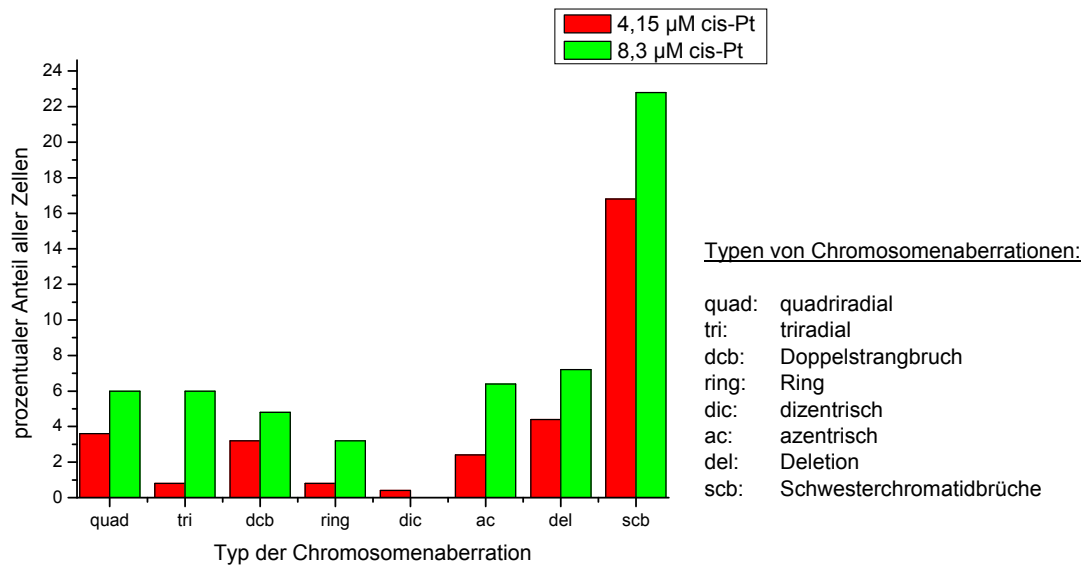
**Abb. 91: Dieselbe Stelle nach der Analyse mittels LA-ICP-MS**

Die gezielte Untersuchung einzelner Metaphasezellen mittels Lichtmikroskopie und LA-ICP-MS wird ermöglicht, indem wie im beschriebenen Schema auf Abb. 76, S. 146 verfahren wird:

Zunächst werden die zu untersuchenden Zellen durch eine Beschriftung mittels LA-ICP-MS markiert, anschließend unter dem Mikroskop optisch ausgewertet und dann per LA-ICP-MS auf ihren Analytgehalt hin untersucht.

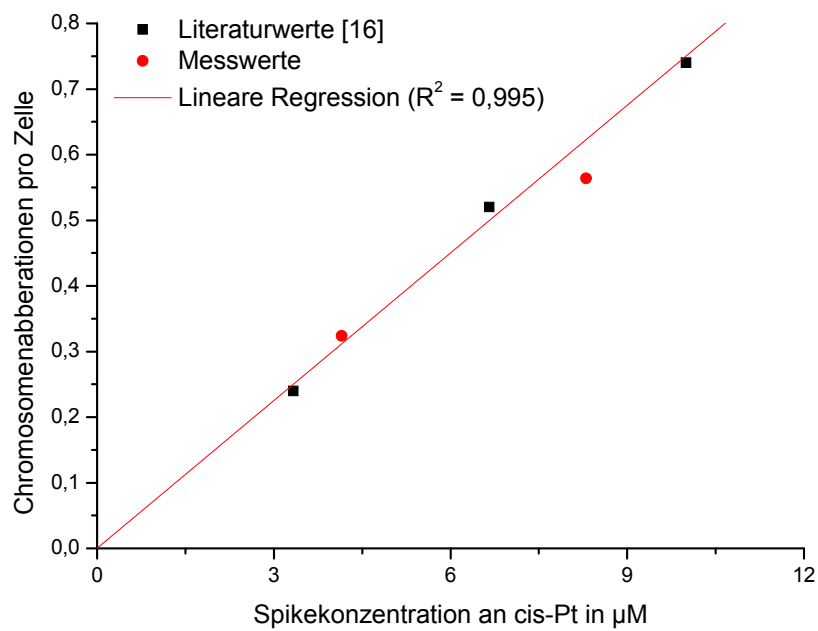
Bei der optischen Auswertung geht es darum, die Anzahl und Art der Chromosomenaberrationen zu bestimmen, die sich nach einer Inkubation mit zwei verschiedenen Konzentrationen ( $4,15 \mu\text{M}$  und  $8,30 \mu\text{M}$ ) an cis-Platin zeigen.

Die optische Auswertung wurde ausgeführt von Herrn Jarek Sochacki im Institut für Genetik der Universität Duisburg-Essen.



**Abb. 92: Auftreten verschiedener Typen von Chromosomenaberrationen in mit verschiedenen Konzentrationen an cis-Platin gespikten CHO-Metaphase-Zellen (jeweils N=250)**

Aus den Ergebnissen ist zu erkennen, dass vor allem Schwesterchromatidbrüche der DNA durch cis-Platin induziert werden. Auch ist eindeutig zu beobachten, dass die Anzahl der Chromosomenaberrationen insgesamt deutlich mit steigender cis-Platin-Konzentration zunimmt. Bei doppelter Spikekonzentration von 8,30 µM zu 4,15 µM steigt die Anzahl der Chromosomenaberrationen von 0,324 pro Zelle auf 0,564 pro Zelle. Diese Werte gehen konform mit Literaturdaten, die im betrachteten Konzentrationsbereich einen linearen Zusammenhang zwischen Spikekonzentration und beobachteter Anzahl an Chromosomenaberrationen pro Zelle aufzeigen<sup>[16]</sup>.



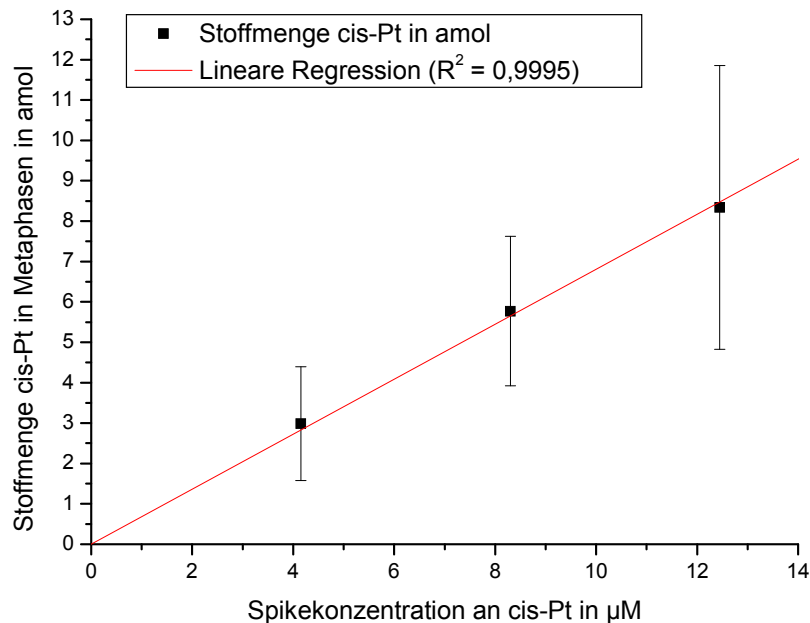
**Abb. 93: Anzahl an Chromosomenaberrationen pro Zelle gegen Spikekonzentration an cis-Pt sowie Vergleich mit Literaturwerten<sup>[16]</sup>**

Bei der anschließenden Analyse der CHO-Metaphasen mittels LA-ICP-MS wird der Platingehalt pro Zelle ermittelt. Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Zunahme der wiedergefundenen Masse an Platin mit zunehmender Spikekonzentration (Tabelle 49). Unter der Annahme, dass das cis-Platin vollständig mit der DNA komplexiert ist, erhält man je nach betrachteter Konzentration bei einer DNA-Länge des Chinesischen Hamsters von  $2,98 \cdot 10^9$  Basenpaaren in einer Metaphase-Zelle (verdoppelte DNA) 3,02 bis 8,43 cis-Pt-DNA-Komplexe je 10000 Basenpaaren.

**Tabelle 49: Platingehalt in cis-Platin gespickten CHO-Metaphasen**

Spikekonzentration an cis-Pt in $\mu\text{M}$	Masse an Pt in fg	Stoffmenge an cis-Pt in amol	Anzahl cis-Platin-Komplexe je 10000 Basenpaare der DNA
4,15	$0,583 \pm 0,275$	$2,987 \pm 1,408$	$3,02 \pm 1,42$
8,30	$1,126 \pm 0,361$	$5,772 \pm 1,849$	$5,83 \pm 1,87$
12,45	$1,627 \pm 0,685$	$8,342 \pm 3,514$	$8,43 \pm 3,55$

Trägt man die gefundene Stoffmenge an cis-Platin in Abhängigkeit zur Spikekonzentration auf, so erhält man im betrachteten Konzentrationsbereich eine weitere lineare Korrelation zwischen diesen (vgl. Abb. 94).



**Abb. 94:** Auftragung der Spikekonzentration gegen gefundene Stoffmenge an cis-Platin in CHO-Metaphase-Zellen

Der im betrachteten Konzentrationsbereich lineare Zusammenhang zwischen der Anzahl an Chromosomenaberrationen pro Zelle und der Spikekonzentration kann also erweitert werden auf den Zusammenhang zwischen der Aberrationsanzahl pro Zelle und dem enthaltenen Platingehalt.

Da wie bereits in Kapitel 4.3.3.2 gezeigt in inkubierten CHO-Zellen 24 h nach dem Ende der Inkubation cis-Platin weder signifikant an der Proteinfraction noch an der RNA sondern ausschließlich an der DNA komplexiert vorkommt, kann gefolgert werden, dass es im betrachteten Konzentrationsbereich einen direkten linearen Zusammenhang zwischen der Anzahl an Chromosomenabberationen und der Menge an durch die DNA komplexierten cis-Platin gibt. Dieser lässt sich aus den Steigungen der Regressionsgeraden von Abb. 93 und Abb. 94 berechnen und ergibt einen Wert von 0,110 Chromosomenaberrationen pro Zelle und pro amol cis-Pt. Dies entspricht einer Chromosomenaberration alle 5,47 Millionen cis-Platin-DNA-Komplexe.

Zur sicheren Beurteilung dieses Sachverhalts sind allerdings weitergehende Untersuchungen notwendig, welche die Spikekonzentrationen über einen größeren Bereich variieren und eine größere Anzahl an Zellen untersuchen, um auch bei kleinen Chromosomenaberrationszahlen noch sinnvolle Ergebnisse erzielen zu können.

## 5 Zusammenfassung

Die Laser-Ablation ist als Probenaufgabesystem der ICP-MS zur direkten Feststoffanalyse eine noch relativ junge Technik. Sie wurde erst 1985 erstmals hierfür angewandt<sup>[18]</sup> und hat sich seitdem schnell weiterentwickelt. Die an sich einfache Methode besitzt jedoch ein großes Problem: Der Laser-Ablationsprozess ist stark von der Probenmatrix abhängig. Da es sich bei der LA-ICP-MS zusätzlich um eine direkte Feststoffanalysenmethode handelt, ist es für die meisten Anwendungen mit dem Ziel einer quantitativen Elementbestimmung schwer, den allgemein üblichen Weg der Kalibration mittels Standardadditionstechnik zu beschreiten. Hauptprobleme hierbei sind die Einbringung eines Standards in die Probe an sich, sowie die Realisierung einer genügend hohen Homogenität, da die Größenordnung der lateralen Auflösung einer Analyse mittels LA-ICP-MS im Mikrometerbereich liegt.

Ziel dieser Arbeit ist es, das Quantifizierungsproblem der LA-ICP-MS für die speziellen Fälle der Untersuchung von biologischen Gewebeschnitten sowie einzelnen Zellen aus Zellkulturen zu lösen und daneben das verwendete LA-System zu charakterisieren und auf die betreffenden Anwendungen hin zu optimieren.

Zunächst wird die Optimierung des LA-Systems beschrieben. Hier findet als erster Schritt die Umstellung des Ablationsgases von Argon auf Helium statt, was eine Verbesserung der Sensitivität um den Faktor zwei zur Folge hat. Desweiteren wird das Volumen der vorhandenen Ablationskammer durch die Einführung eines neuen Einsatzes für die Ablationskammerschublade so weit reduziert, wie es ohne einen massiven, kostenintensiven Umbau oder eine Neuentwicklung des Probenaufgabesystems möglich ist. Dies bringt eine Reduktion des effektiven Ablationskammervolumens um ca. 20% mit sich. Die anschließende orts aufgelöste Untersuchung des Auswaschverhaltens mittels Einzelschussanalysen zeigt eine signifikante Verbesserung des Auswaschverhaltens durch die Volumenreduktion. Desweiteren wird festgestellt, dass es sich in der Ablationskammer um laminare Strömungsverhältnisse handelt, die ähnlich denen in einer zylindrischen Ablationskammer sind, wie sie in der Literatur beschrieben sind<sup>[90]</sup>.

Zur Untersuchung von gefrorenen Proben wird die käuflich von der Firma New Wave Technologies erworbene Kryozelle installiert und die Temperatursteuerung

charakterisiert. So kann festgestellt werden, dass idealerweise bei programmierten Temperaturen von unter  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  gearbeitet werden sollte, um das Probenmaterial wirksam am Auftauen zu hindern, da die Oberflächentemperatur der Probe auf Grund des nicht vorgekühlten Ablationsgasstroms von der eingestellten Kerntemperatur der Kryozelle deutlich nach oben hin abweicht. Durch Entwicklung eines passenden Einsatzes in die Kryozellenablationskammerschublade wird hier eine identische volumenreduzierte Kammergeometrie erreicht, wie bei der normalen Ablationskammer.

Eine Vereinfachung des Einstellungsverfahrens der P/A-Faktoren wird durch die Verwendung des hochkonzentrierten Standardreferenzmaterials NIST 610 erreicht, so dass für diesen Zweck nicht mehr das Laser-Ablationssystem gegen die Flüssigkeitsaufgabe ersetzt werden muss.

Die Energiedichte der Laserstrahlung erfährt bei längeren Messungen eine deutliche negative Drift. Durch Aufnahme dieser Drift wird festgestellt, dass eine Vorwärmzeit von mindestens einer Stunde nicht unterschritten werden sollte, um einen negativen Einfluss auf die Analysenergebnisse zu vermeiden.

Die Lösung des Quantifizierungsproblems der LA-ICP-MS bezüglich der orts aufgelösten Untersuchung von Gewebeschnitten wird anhand der Modellmatrix Schweineleber untersucht. Zunächst wird die Matrix ausführlich charakterisiert. Hierzu werden der Wassergehalt, der Glühverlust, der CHNSO-Gehalt sowie der Gehalt an Spurenelementen bestimmt.

Im nächsten Schritt wird eine Methode entwickelt wie mittels Standardaddition die LA-ICP-MS bezüglich der orts aufgelösten Untersuchung von Schweineleber kalibriert werden kann. Der Kalibrationsstandard wird eingeführt, indem in gemahlenem, gefriergetrocknetem Gewebe der ehemalige Wassergehalt durch das gleiche Volumen eines Standards ersetzt wird.

Da dieses Verfahren jedoch sehr zeitintensiv ist und auch eine relativ große Menge an Probenmatrix benötigt, die gerade bei der Untersuchung von Gewebeproben oft nicht verfügbar ist, wird ein alternatives Kalibrationsverfahren entwickelt. Es beruht auf der Nachahmung der Probenmatrix durch ein entsprechend angesetztes Polyacrylamid-Gel, das im CHNO-Gehalt sowie im Wassergehalt der Probenmatrix entspricht, gegenüber dieser aber keinen natürlichen Spurenelementhintergrund aufweist und die Möglichkeit bietet, den Standard absolut homogen einzubringen. Es

wird gezeigt, dass mittels solcher matrixangepasster, gespikter Gelschnitte die LA-ICP-MS extern valide für die orts aufgelöste Untersuchung von Gewebeschnitten kalibriert werden kann. Hierzu werden die Ergebnisse sowohl mit den Aufschlussresultaten wie auch mit den Ergebnissen aus der Standardadditionskalibration verglichen.

Ein neues hier vorgestelltes Anwendungsgebiet der LA-ICP-MS ist die Untersuchung einzelner Zellen einer Zellkultur auf ihren Elementgehalt. Mittels Einzelschussuntersuchungen kann eine ganze Zelle, dessen Position zuvor einprogrammiert wurde, auf einmal abliert werden und das erzeugte Signal durch Integration ausgewertet werden.

Hierzu werden zwei Ansätze von Kalibrationsverfahren vorgestellt, miteinander verglichen und auf die Validität ihrer Ergebnisse hin überprüft.

Im ersten Verfahren werden definierte Mengen eines Standards auf einen Objektträger aufgetropft, getrocknet und anschließend die Auftragungsflächen flächendeckend mittels LA-ICP-MS untersucht. Die Integrale der Signale der verschiedenen Standardmengen liefern hierbei die Basis einer Kalibrationsgerade.

Die zweite Kalibrationstechnik ist der für die Gewebeschnitte verwendeten sehr ähnlich. Auch hierfür werden matrixangepasste Polyacrylamid-Gelschnitte hergestellt, die bereits den Kalibrationsstandard in einer bekannten Konzentration enthalten. Zur Kalibration der LA-ICP-MS werden diese Gelschnitte mit denselben Geräteparametern (Einzelschussanalysen) wie bei der Analyse der Zellen untersucht. Anhand des ablierten Gelvolumens, der bekannten Analytkonzentration im Gel und des entsprechenden Signalintegrals kann die Kalibrationsgerade erstellt werden.

Eine Validierung der Ergebnisse dieser Techniken ist bis jetzt nicht durch den sonst üblichen Weg des Vergleiches mit einem zertifizierten Standardreferenzmaterial möglich, da ein Geeignetes nicht verfügbar ist. Um dennoch die Richtigkeit der Ergebnisse zu zeigen, wird die Größe des Genoms einer CHO-Zelle als Vergleichsgröße verwendet, da ein Basenpaar der DNA genau zwei Phosphoratomen entspricht. Der Vergleich des gefundenen Phosphorgehalts einer CHO-Zelle, bei der alle Phosphorquellen außer der DNA eliminiert wurden, mit der theoretisch erwarteten Menge an Phosphor aus der DNA zeigt für die Kalibrationstechnik durch aufgetropfte Standards auf Grund mangelnder



Matrixanpassung eine starke systematische Abweichung vom Erwartungswert von über einer Größenordnung, während die Technik über matrixangepasste gespikte Polyacrylgelschnitte valide Ergebnisse liefert. Mittels der Gelschnittkalibrationstechnik ist es also möglich den Spurenelementgehalt einzelner Zellen zu bestimmen.

Eine Anwendung dieser neuen Untersuchungsmethode wird anhand der Analyse von cis-Platin gespikten CHO-Zellen vorgestellt. Untersucht werden die Zellen jeweils auf ihren Phosphor- und Platingehalt.

In cis-Platin gespikten CHO-Interphase-Zellen kann bei steigender Spikekonzentration ein konstanter Phosphorgehalt und ein zunehmender Platingehalt festgestellt werden. Durch Analysen von CHO-Interphase-Zellen, die entweder mit RNase, Pepsin oder mit beidem behandelt wurden, wird gezeigt, dass nach einer Inkubation der Zellen mit cis-Platin dieses aufgenommen wird und signifikant ausschließlich an die DNA bindet. Durch die sequenzielle Untersuchung von CHO-Metaphase-Zellen mittels Lichtmikroskopie und LA-ICP-MS können lineare Abhängigkeiten zwischen der Spikekonzentration, der von den Zellen aufgenommenen Menge an cis-Platin und der Anzahl an durch cis-Platin induzierten Chromosomenabberationen pro Zelle gezeigt werden.

Das neu entwickelte Anwendungsgebiet der LA-ICP-MS der Untersuchung einzelner Zellen aus Zellkulturen hat viel Potential für die Zukunft, wo immer es um die empfindliche Einzel- oder Multielementbestimmung von Spurenkonzentrationen in Zellen geht.

## 6      **Ausblick**

Die Entwicklung der Analysetechnik der LA-ICP-MS ist bis heute noch nicht vollständig abgeschlossen. Immernoch wird an einem vollständigen Verständnis des Ablationsprozesses, des Aerosoltransports und des Aufschlusses der Aerosolpartikel im induktiv gekoppelten Plasma geforscht. Die Folgen der daraus gewonnenen Erkenntnisse fließen in die Entwicklung neuer Geräte ein (Design der Ablationskammer, Femtosekunden-UV-Laser etc.). Deshalb ist es auch in Zukunft notwendig, die aktuellen methodenrelevanten Entwicklungen mitzuverfolgen und wenn möglich in das Laser-Ablationssystem zu implementieren.

Bereits bekannte Punkte, in denen Optimierungsbedarf besteht, sind die Drift der Energiedichte bei längeren Messungen (mögliche Lösungsansätze: automatische Nachführung der Energiedichte oder Temperaturkontrolle für Frequenzvervielfacher), das Design der Ablationskammer (z. B. Rüsseldesign<sup>[36]</sup>), die Temperatureinstellung des Ablationsgasstroms zur Kryozelle sowie ein Autofokus für den Laser für nicht ganz ideal ebene Proben. Auch könnte eine Kryozelle für den Betrieb bei Temperaturen unter -60 °C entwickelt werden, da dies eine Reduktion des Signalrauschens mit sich bringt<sup>[169]</sup>.

Die LA-ICP-MS ist eine der wenigen Analysetechniken, die es erlaubt, simultan orts aufgelöste Verteilungen verschiedener Elemente über einen großen Konzentrationsbereich aufzunehmen.

Überall dort, wo es auf die orts aufgelöste Untersuchung von physiologisch relevanten Elementen, Metallopharmazeutika, metallmarkierten Antikörpern oder metall(oid)basierten Intoxikationseffekten in Geweben ankommt, kann ihr Einsatz interessant sein. Ein großes Ziel bisheriger Untersuchungen war neben anderen Geweben und Tumoren zum Beispiel das Gehirn, vor allem im Hinblick auf die Erforschung der Rolle von Metallionen in neurodegenerativen Krankheiten wie Creutzfeldt-Jakob, Parkinson oder Alzheimer.

Die Möglichkeit nicht nur relative Elementverteilungen zu erhalten, sondern auch an absolute Konzentrationsangaben über einen großen Konzentrationsbereich zu gelangen, ist sinnvoll und kann zur Erlangung eines tieferen Verständnisses

biologischer, toxikologischer oder pharmazeutischer Effekte und Zusammenhänge notwendig sein.

Eine einfache Methode der Kalibration der LA-ICP-MS wie sie hier vorgestellt wird, ebnet für entsprechende Anwendungen den Weg und könnte zu einer weiteren Verbreitung der Visualisierung von Elementverteilungen mittels LA-ICP-MS in Gewebeschnitten beitragen.

Die neue Methode der Untersuchung einzelner Zellen einer Zellkultur auf ihren Spurenelementgehalt mittels LA-ICP-MS ist in dieser Arbeit vorgestellt worden. Sie zeigt ein großes Potential in der Erforschung der Wirkung von Metallozytostatika auf eukaryontische Zellen auf, wie es anhand von cis-Platin inkubierten CHO-Zellen demonstriert worden ist.

Ergänzend zu den durchgeführten Arbeiten können weiterführende Versuche die Aufnahme und Elimination von cis-Platin in die bzw. aus den CHO-Zellen untersuchen. Der Konzentrationsbereich, in dem der Zusammenhang zwischen der Inkubationskonzentration, der aufgenommenen Platinmenge und der Anzahl an gebildeten Chromosomenaberrationen untersucht wurde, könnte erweitert werden. Auch können äquivalente Studien mit anderen Zelllinien und anderen Metallozytostatika wie Carbo- oder Oxali-Platin durchgeführt werden.

Die Kalibrationsmethode wurde bisher nur auf dem unüblichen Weg über die feste Größe des Genoms einer CHO-Zelle überprüft. Eine Validierung auf dem üblichen Weg über zertifizierte Standardreferenzmaterialien sollte bei deren zukünftiger Verfügbarkeit baldmöglichst nachgeholt werden.

Neben der hier vorgestellten Untersuchung kultivierter Zellen nach Inkubation mittels eines Metallozytostatikums sind eine Vielzahl anderer Anwendungen der LA-ICP-MS auf kultivierte Zellen denkbar, bei denen es auf die Bestimmung von Elementkonzentrationen im Spurenbereich ankommt. Insbesondere die möglichen Synergien durch vorher angewandte optische Untersuchungsmethoden wie der Lichtmikroskopie oder Fluoreszenztechniken lassen vielfältige Anwendungen erhoffen.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] da Silva JJRF, Williams RJP (2001) The biological chemistry of the elements - The inorganic chemistry of life. 2nd Edition, Oxford University Press, New York
- [2] Hippler J, Müller SD, Reichel RAD, Braescher M, Hirner AV et al. (2010) Intracellular speciation of arsenic compounds in human urothelial and hepatic cells. In: Arsenic in Geosphere and Human Diseases (eds. Jean J, Bundschuh J, Bhattacharya P) 1st edition, Taylor & Francis Group, London
- [3] Hippler J, Hoppe HW, Mosel F, Rettenmeier AW, Hirner AV (2009) Comparative determination of methyl mercury in whole blood samples using GC-ICP-MS and GC-MS techniques. *Journal of Chromatography B*, 877 (24) 2465-2470
- [4] Rabieh S, Hirner AV, Matschullat J (2008) Determination of arsenic species in human urine using high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 23 (4) 544-549
- [5] Hirner A (2006) Speciation of alkylated metals and metalloids in the environment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385 (3) 555-567
- [6] Sigel A, Sigel H, Sigel RKO (2006) Neurodegenerative diseases and metal ions. 1st edition, John Wiley & Sons, New York
- [7] Zoriy M, Matusch A, Spruss T, Becker JS (2007) Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry for imaging of copper, zinc, and platinum in thin sections of a kidney from a mouse treated with cis-platin. *International Journal of Mass Spectrometry*, 260 (2-3) 102-106
- [8] Sekaran NC (2006) Laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry for 2D mapping of trace elements in soft tissues. *Current Science*, 90 (2) 221-225

- 
- [9] Pugh JAT, Cox AG, Mcleod CW, Bunch J, Whitby B et al. (2011) A novel calibration strategy for analysis and imaging of biological thin sections by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 26 (8) 1667-1673
- [10] Puck TT, Cieciura SJ, Robinson A (1958) Genetics of somatic mammalian cells: III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *Journal of Experimental Medicine*, 108 (6) 945-956
- [11] Puck TT (1985) Development of the Chinese hamster ovary (CHO) cell. In: *Molecular Cell Genetics* 1st edition, John Wiley & Sons, New York
- [12] Jayapal KR, Wlaschin KF, Hu WS, Yap MGS (2007) Recombinant protein therapeutics from CHO cells - 20 years and counting. *Chemical Engineering Progress*, 103 (10) 40-47
- [13] Puck TT, Sanders P, Petersen D (1964) Life cycle analysis of mammalian cells: II. Cells from the Chinese hamster ovary grown in suspension culture. *Biophysical Journal*, 4 (6) 441-450
- [14] Wang D, Lippard SJ (2005) Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov*, 4 (4) 307-320
- [15] Chaney SG, Campbell SL, Bassett E, Wu Y (2005) Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 53 (1) 3-11
- [16] Krishnaswamy G, Dewey WC (1993) Cisplatin induced cell killing and chromosomal aberrations in CHO cells: treated during G1 or S phase. *Mutation Research/DNA Repair*, 293 (2) 161-172
- [17] Thompson M, Goulter JE, Sieper F (1981) Laser ablation for the introduction of solid samples into an inductively coupled plasma for atomic-emission spectrometry. *Analyst (Cambridge, United Kingdom)*, 106 (1258) 32-39
- [18] Gray AL (1985) Solid sample introduction by laser ablation for inductively coupled plasma source mass spectrometry. *Analyst*, 110 551-556

- 
- [19] Durrant SF (1999) Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: achievements, problems, prospects. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 14 (9) 1385-1403
- [20] Durrant SF, Ward NI (2005) Recent biological and environmental applications of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 20 (9) 821-829
- [21] Yang CK, Chi PH, Lin YC, Sun YC, Yang MH (2010) Development of an on-line isotope dilution laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) method for determination of boron in silicon wafers. *Talanta*, 80 (3) 1222-1227
- [22] Becker JS, Dietze HJ (2003) State-of-the-art in inorganic mass spectrometry for analysis of high-purity materials. *International Journal of Mass Spectrometry*, 228 (2-3) 127-150
- [23] Cocherie A, Robert M (2008) Laser ablation coupled with ICP-MS applied to U-Pb zircon geochronology: A review of recent advances. *Gondwana Research*, 14 (4) 597-608
- [24] Günther D, Audetat A, Frischknecht R, Heinrich A (1998) Quantitative analysis of major, minor and trace elements in fluid inclusions using laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 13 (4) 263-270
- [25] Watling J, Lynch F, Herring D (1997) Use of Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for Fingerprinting Scene of Crime Evidence. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 12 (2) 195-203
- [26] Deconinck I, Latkoczy C, Günther D, Govaert F, Vanhaecke F (2006) Capabilities of laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry for (trace) element analysis of car paints for forensic purposes. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 21 (3) 279-287
- [27] Giussani B, Monticelli D, Rampazzi L (2009) Role of laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry in cultural heritage research: A review. *Analytica Chimica Acta*, 635 (1) 6-21

- 
- [28] Resano M, Garcia E, Vanhaecke F (2010) Laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry in archaeometric research. *Mass Spectrometry Reviews*, 29 (1) 55-78
- [29] Kang D, Amarasiriwardena D, Goodman AH (2004) Application of laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry (LA-ICP-MS) to investigate trace metal spatial distributions in human tooth enamel and dentine growth layers and pulp. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378 (6) 1608-1615
- [30] Müller SD, Diaz-Bobe RA, Felix J, Goedecke W (2005) Detection of specific proteins by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) using gold cluster labelled antibodies. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 20 (9) 907-911
- [31] Krause-Buchholz U, Becker JS, Zoriy M, Pickhardt C, Przybylski M et al. (2006) Detection of phosphorylated subunits by combined LA-ICP-MS and MALDI-FTICR-MS analysis in yeast mitochondrial membrane complexes separated by blue native/SDS-PAGE. *International Journal of Mass Spectrometry*, 248 (1-2) 56-60
- [32] Neilsen JL, Abildtrup A, Christensen J, Watson P, Cox A et al. (1998) Laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry in combination with gel electrophoresis: a new strategy for speciation of metal binding serum proteins. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 53 (2) 339-345
- [33] Koch J, Günther D (2011) Review of the state-of-the-art of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Applied Spectroscopy*, 65 (5) 155A-162A
- [34] Becker JS (2002) Applications of inductively coupled plasma mass spectrometry and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry in materials science. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 57 (12) 1805-1820

- 
- [35] Kläntschi N, Lienemann P, Richner P, Vonmont H (1996) Elementanalytik - Instrumenteller Nachweis und Bestimmung von Elementen und deren Verbindungen. 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- [36] Arrowsmith P, Hughes SK (1988) Entrainment and transport of laser ablated plumes for subsequent elemental analysis. *Applied Spectroscopy*, 42 1231-1239
- [37] Geertsen C, Briand A, Chartier F, Lacour JL, Mauchien P et al. (1994) Comparison between infrared and ultraviolet-laser ablation at atmospheric-pressure - Implications for solid sampling inductively-coupled plasma spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 9 (1) 17-22
- [38] Cromwell EF, Arrowsmith P (1995) Fractionation effects in laser-ablation inductively-coupled plasma-mass spectrometry. *Applied Spectroscopy*, 49 (11) 1652-1660
- [39] Eggins SM, Kinsley LPJ, Shelley JMG (1998) Deposition and element fractionation processes during atmospheric pressure laser sampling for analysis by ICP-MS. *Applied Surface Science*, 127 278-286
- [40] Günther D, Hattendorf B (2001) Elemental fractionation in LA-ICP-MS (Sylvester, P.J., Ed.). Mineralogical Association of Canada (MAC) Short Course Series, 29 83-91
- [41] Russo RE, Mao XL, Borisov OV, Liu HC (2000) Influence of wavelength on fractionation in laser ablation ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 15 (9) 1115-1120
- [42] Jeong SH, Borisov OV, Yoo JH, Mao XL, Russo RE (1999) Effects of particle size distribution on inductively coupled plasma mass spectrometry signal intensity during laser ablation of glass samples. *Analytical Chemistry*, 71 (22) 5123-5130
- [43] Guillon M, Günther D (2002) Effect of particle size distribution on ICP-induced elemental fractionation in laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 17 (8) 831-837



- 
- [44] Horn I, Günther D (2003) The influence of ablation carrier gasses Ar, He and Ne on the particle size distribution and transport efficiencies of laser ablation-induced aerosols: implications for LA-ICP-MS. *Applied Surface Science*, 207 (1-4) 144-157
- [45] Russo RE, Mao XL, Gonzalez JJ, Mao SS (2002) Femtosecond laser ablation ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 17 (9) 1072-1075
- [46] Gonzalez J, Liu CY, Mao XL, Russo RE (2004) UV-femtosecond laser ablation-ICP-MS for analysis of alloy samples. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 19 (9) 1165-1168
- [47] Gonzalez J, Dundas SH, Liu CY, Mao XL, Russo RE (2006) UV-femtosecond and nanosecond laser ablation-ICP-MS: internal and external repeatability. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 21 (8) 778-784
- [48] Gurevich EL, Hergenroder R (2007) A simple laser ICP-MS ablation cell with wash-out time less than 100 ms. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 22 (9) 1043-1050
- [49] Autrique D, Bogaerts A, Lindner H, Garcia CC, Niemax K (2008) Design analysis of a laser ablation cell for inductively coupled plasma mass spectrometry by numerical simulation. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 63 (2) 257-270
- [50] Bogaerts A, Chen ZY (2005) Effect of laser parameters on laser ablation and laser-induced plasma formation: A numerical modeling investigation. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 60 (9-10) 1280-1307
- [51] Bogaerts A, Chen ZY, Bleiner D (2006) Laser ablation of copper in different background gases: comparative study by numerical modeling and experiments. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 21 (4) 384-395
- [52] Hergenroder R (2006) A model for the generation of small particles in laser ablation ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 21 (10) 1016-1026

- 
- [53] Hergenroder R (2006) A model of non-congruent laser ablation as a source of fractionation effects in LA-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 21 (5) 505-516
- [54] Lindner H, Autrique D, Pisonero J, Günther D, Bogaerts A (2010) Numerical simulation analysis of flow patterns and particle transport in the HEAD laser ablation cell with respect to inductively coupled plasma spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 25 (3) 295-304
- [55] Garcia CC, Lindner H, Niemax K (2009) Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry-current shortcomings, practical suggestions for improving performance, and experiments to guide future development. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 24 (1) 14-26
- [56] Hergenroder R (2006) Laser-generated aerosols in laser ablation for inductively coupled plasma spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 61 (3) 284-300
- [57] Hergenroder R (2006) Hydrodynamic sputtering as a possible source for fractionation in LA-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 21 (5) 517-524
- [58] Allmen Mv, Blatter A (1998) *Laser-beam interactions with materials - physical principles and applications*. 2nd edition, Springer Verlag,
- [59] Koch J, von Bohlen A, Hergenroder R, Niemax K (2004) Particle size distributions and compositions of aerosols produced by near-IR femto- and nanosecond laser ablation of brass. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 19 (2) 267-272
- [60] Bogaerts A, Chen ZY, Gijbels R, Vertes A (2003) Laser ablation for analytical sampling: what can we learn from modeling? *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 58 (11) 1867-1893
- [61] Mao XL, Chan WT, Caetano M, Shannon MA, Russo RE (1996) Preferential vaporization and plasma shielding during nano-second laser ablation. *Applied Surface Science*, 96-8 126-130

- [62] Russo RE, Mao XL, Mao SS (2002) The physics of laser ablation in microchemical analysis. *Analytical Chemistry*, 74 (3) 70A-77A
- [63] DucreuxZappa M, Mermet JM (1996) Analysis of glass by UV laser ablation inductively coupled plasma atomic emission spectrometry .1. Effects of the laser parameters on the amount of ablated material and the temporal behaviour of the signal for different types of laser. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 51 (3) 321-332
- [64] Alexander ML, Smith MR, Hartman JS, Mendoza A, Koppenaal DW (1998) Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Applied Surface Science*, 127-129 255-261
- [65] Guillon M, Horn I, Günther D (2003) A comparison of 266 nm, 213 nm and 193 nm produced from a single solid state Nd : YAG laser for laser ablation ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 18 (10) 1224-1230
- [66] Kaye GWC, Laby TH (1995) Tables of physical and chemical constants and some mathematical functions. 16th edition, Longman, London
- [67] Mao XL, Borisov OV, Russo RE (1998) Enhancements in laser ablation inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry based on laser properties and ambient environment. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 53 (5) 731-739
- [68] Jeffries E, Jackson E, Longerich P (1998) Application of a frequency quintupled Nd:YAG source ( $\lambda=213$  nm) for laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometric analysis of minerals. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 13 (9) 935-940
- [69] Becker JS (2007) *Inorganic mass spectrometry: Principles and applications*. 1st edition, John Wiley & Sons, New York
- [70] Saetveit NJ, Bajic SJ, Baldwin DP, Houk RS (2008) Influence of particle size on fractionation with nanosecond and femtosecond laser ablation in brass by online differential mobility analysis and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 23 (1) 54-61

- 
- [71] Outridge PM, Doherty W, Gregoire DC (1997) Ablative and transport fractionation of trace elements during laser sampling of glass and copper. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 52 (14) 2093-2102
- [72] Rethfeld B, Sokolowski-Tinten K, der Linde D, Anisimov SI (2004) Timescales in the response of materials to femtosecond laser excitation. *Applied Physics A: Materials Science & Processing*, 79 (4) 767-769
- [73] Chichkov BN, Momma C, Nolte S, von Alvensleben F, Tünnermann A (1996) Femtosecond, picosecond and nanosecond laser ablation of solids. *Applied Physics A: Materials Science & Processing*, 63 (2) 109-115
- [74] Koch J, Lindner H, von Bohlen A, Hergenroder R, Niemax K (2005) Elemental fractionation of dielectric aerosols produced by near-infrared femtosecond laser ablation of silicate glasses. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 20 (9) 901-906
- [75] Pisonero J, Fliegel D, Günther D (2006) High efficiency aerosol dispersion cell for laser ablation-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 21 (9) 922-931
- [76] Kuhn HR, Günther D (2005) The agglomeration state of nanosecond laser-generated aerosol particles entering the ICP. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 383 (3) 434-441
- [77] Fliegel D, Günther D (2006) Low pressure laser ablation coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 61 (7) 841-849
- [78] Taylor HE (2001) *Inductively coupled plasma-mass spectrometry: practices and techniques*. 1st edition, Academic Press Inc., San Diego, USA
- [79] Günther D, Heinrich CA (1999) Enhanced sensitivity in laser ablation-ICP mass spectrometry using helium-argon mixtures as aerosol carrier - Plenary lecture. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 14 (9) 1363-1368
- [80] Kuhn HR, Koch J, Hergenröder R, Niemax K, Kalberer M et al. (2005) Evaluation of different techniques for particle size distribution measurements

- on laser-generated aerosols. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 20 (9) 894-900
- [81] Horn I, Guillon M, Günther D (2001) Wavelength dependant ablation rates for metals and silicate glasses using homogenized laser beam profiles - implications for LA-ICP-MS. *Applied Surface Science*, 182 (1-2) 91-102
- [82] Chandrasekhar S (1981) *Hydrodynamic and hydromagnetic stability*. 1st Edition, Dover Publ Inc., Dover
- [83] Houk S, Winge K, Chen X (1997) High speed photographic study of wet droplets and solid particles in the inductively coupled plasma. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 12 (10) 1139-1148
- [84] Huang Y, Shibata Y, Morita M (1993) Micro laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry. 1. Instrumentation and performance of micro laser ablation system. *Analytical Chemistry*, 65 (21) 2999-3003
- [85] Garcia CC, Lindner H, Niemax K (2007) Transport efficiency in femtosecond laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry applying ablation cells with short and long washout times. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 62 (1) 13-19
- [86] Garcia CC, Walle M, Lindner H, Koch J, Niemax K et al. (2008) Femtosecond laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: Transport efficiencies of aerosols released under argon atmosphere and the importance of the focus position. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 63 (2) 271-276
- [87] Lide DR (2007) *CRC Handbook of chemistry and physics*. 88th edition, Taylor & Francis, London
- [88] Baron PA, Willeke K (2005) *Aerosol measurement: Principles, techniques and applications*. 2nd Edition, John Wiley & Sons, New York
- [89] Perdian DC, Bajic SJ, Baldwin DP, Houk RS (2008) Time-resolved studies of particle effects in laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 23 (3) 325-335

- 
- [90] Koch J, Walle M, Dietiker R, Günther D (2008) Analysis of laser-produced aerosols by inductively coupled plasma mass spectrometry: Transport phenomena and elemental fractionation. *Analytical Chemistry*, 80 (4) 915-921
- [91] Bleiner D, Günther D (2001) Theoretical description and experimental observation of aerosol transport processes in laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 16 (5) 449-456
- [92] Bearns M, Hofmann H, Renken A (1999) *Chemische Reaktionstechnik - Lehrbuch der Technischen Chemie*. 3. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim
- [93] Bleiner D, Bogaerts A (2006) Computer simulations of laser ablation sample introduction for plasma-source elemental microanalysis. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 21 (11) 1161-1174
- [94] Wedler G (1997) *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*. 4. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim
- [95] Ishizuka T, Uwamino Y (1983) Inductively coupled plasma emission spectrometry of solid samples by laser ablation. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 38 519-527
- [96] Gray AL, Date AR (1983) Inductively coupled plasma source mass spectrometry using continuum flow ion extraction. *Analyst*, 108 (1290) 1033-1050
- [97] Houk RS, Fassel VA, Flesch GD, Svec HJ, Gray AL et al. (1980) Inductively coupled argon plasma as an ion source for mass spectrometric determination of trace elements. *Analytical Chemistry*, 52 (14) 2283-2289
- [98] Date AR, Gray AL (1981) Plasma source mass spectrometry using an inductively coupled plasma and a high resolution quadrupole mass filter. *Analyst*, 106 (1269) 1255-1267
- [99] Schwedt G (2008) *Analytische Chemie - Grundlagen, Methoden und Praxis*. 2. Auflage, Wiley-VCH Verlag, Weinheim

- 
- [100] Nelms SM (2005) ICP mass spectrometry handbook. 1st edition, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK
- [101] Cammann K (2001) Instrumentelle Analytische Chemie - Verfahren, Anwendungen, Qualitätssicherung. 1. Auflage, Spectrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg
- [102] Prange A, Profrock D (2005) Application of CE-ICP-MS and CE-ESI-MS in metalloproteomics: challenges, developments, and limitations. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 383 (3) 372-389
- [103] Sylvester PJ (2001) Laser-Ablation-ICPMS in the earth sciences - principles and applications. 1st edition, Mineralogical association of Canada,
- [104] Pisonero J, Fernandez B, Günther D (2009) Critical revision of GD-MS, LA-ICP-MS and SIMS as inorganic mass spectrometric techniques for direct solid analysis. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 24 (9) 1145-1160
- [105] Macedone JH, Gammon DJ, Farnsworth PB (2001) Factors affecting analyte transport through the sampling orifice of an inductively coupled plasma mass spectrometer. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 56 (9) 1687-1695
- [106] Jorabchi K, Brennan RG, Levine JA, Montaser A (2006) Interferometric droplet imaging for in situ aerosol characterization in an inductively coupled plasma. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 21 (9) 839-846
- [107] Olesik JW, Bates LC (1995) Characterization of aerosols produced by pneumatic nebulizers for inductively coupled plasma sample introduction: effect of liquid and gas flow rates on volume based drop size distributions. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 50 (4-7) 285-303
- [108] Agilent Technologies Inc. (2005) ICP-MS - Inductively coupled plasma mass spectrometry - A primer. 1st edition, Agilent Technologies Inc., USA
- [109] Kuhn HR, Guillon M, Günther D (2004) Size-related vaporisation and ionisation of laser-induced glass particles in the inductively coupled plasma. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378 (4) 1069-1074

- 
- [110] National Institute of Standards & Technology (1992) Certificate of analysis - standard reference material 610, Trace elements in a glass matrix. Nominal trace element concentration 500 mg/kg.
- [111] National Institute of Standards & Technology (1992) Certificate of analysis - standard reference material 612, Trace elements in a glass matrix.
- [112] Craig CA, Jarvis KE, Clarke LJ (2000) An assessment of calibration strategies for the quantitative and semi-quantitative analysis of calcium carbonate matrices by laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 15 (8) 1001-1008
- [113] Becker JS, Pickhardt C, Dietze HJ (2001) Determination of trace elements in high-purity platinum by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry using solution calibration. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 16 (6) 603-606
- [114] Leach JJ, Allen LA, Aeschliman DB, Houk RS (1999) Calibration of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry using standard additions with dried solution aerosols. *Analytical Chemistry*, 71 (2) 440-445
- [115] John Watling R (1998) In-line mass transport measurement cell for improving quantification in sulfide mineral analysis using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 13 (9) 927-934
- [116] Rodushkin I, Axelsson MD, Malinovsky D, Baxter DC (2002) Analyte- and matrix-dependent elemental response variations in laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry - Part 1. The roles of plasma and ion sampling conditions. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 17 (10) 1223-1230
- [117] Rodushkin I, Axelsson MD, Malinovsky D, Baxter DC (2002) Analyte- and matrix-dependent elemental response variations in laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry - Part 2. Implications for multi-element analyses. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 17 (10) 1231-1239



- 
- [118] Austin C, Hare D, Rawling T, McDonagh AM, Doble P (2010) Quantification method for elemental bio-imaging by LA-ICP-MS using metal spiked PMMA films. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 25 (5) 722-725
- [119] Poitrasson F, Mao X, Mao SS, Freydier R, Russo RE (2003) Comparison of ultraviolet femtosecond and nanosecond laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry analysis in glass, monazite, and zircon. *Analytical Chemistry*, 75 (22) 6184-6190
- [120] Bian Q, Garcia CC, Koch J, Niemax K (2006) Non-matrix matched calibration of major and minor concentrations of Zn and Cu in brass, aluminium and silicate glass using NIR femtosecond laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 21 (2) 187-191
- [121] Mozna V, Pisonero J, Hola M, Kanicky V, Günther D (2006) Quantitative analysis of Fe-based samples using ultraviolet nanosecond and femtosecond laser ablation-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 21 (11) 1194-1201
- [122] Steinhoefel G, Breuer J, von Blanckenburg F, Horn I, Kaczorek D et al. (2011) Micrometer silicon isotope diagnostics of soils by UV femtosecond laser ablation. *Chemical Geology*, 286 (3-4) 280-289
- [123] Hitzel E (2007) *Bausteine praktischer Analytik*. 2. Auflage, Verlag Handwerk und Technik, Hamburg
- [124] Tibi M, Heumann KG (2003) Isotope dilution mass spectrometry as a calibration method for the analysis of trace elements in powder samples by LA-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 18 (9) 1076-1081
- [125] Bucher O, Wartenburg H (1989) *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*. 11. Auflage, Verlag Hans Huber, Bern
- [126] Plattner H, Hentschel J (2006) *Zellbiologie*. 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- [127] Campbell NA, Reece JB, Markl J (2006) *Biologie*. 6. Auflage, Pearson Studium, München

- 
- [128] Tjio JH, Puck TT (1958) Genetics of somatic mammalian cells: II. Chromosomal constitution of cells in tissue culture. *The Journal of Experimental Medicine*, 108 (2) 259-268
- [129] Xu X, Nagarajan H, Lewis NE, Pan S, Cai Z et al. (2011) The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line. *Nat Biotech*, 29 (8) 735-741
- [130] Bachmann K (1972) Genome size in mammals. *Chromosoma*, 37 (1) 85-93
- [131] Kato H, Harada M, Tsuchiya K, Moriwaki K (1980) Absence of correlation between DNA repair in UV irradiated mammalian cells and life span of donor species. *Japanese Journal of Genetics*, 55 (2) 99-108
- [132] Dolezel J, Bartos J, Voglmayr H, Greilhuber J (2003) Letter to the editor - Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry Part A*, 51A (2) 127-128
- [133] Human Genome Sequencing Consortium (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 431 (7011) 931-945
- [134] Fiore M, Zanier R, Degrossi F (2002) Reversible G1 arrest by dimethyl sulfoxide as a new method to synchronize Chinese hamster cells. *Mutagenesis*, 17 (5) 419-424
- [135] Batista L, Chigancas V, Brumatti G, Amarante-Mendes G, Menck C (2006) Involvement of DNA replication in ultraviolet-induced apoptosis of mammalian cells. *Apoptosis*, 11 (7) 1139-1148
- [136] Dunkern TR, Kaina B (2002) Cell proliferation and DNA breaks are involved in ultraviolet light-induced apoptosis in nucleotide excision repair-deficient Chinese hamster cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13 (1) 348-361
- [137] Martinez-Lopez W, Porro V, Folle GA, Mendez-Acuna L, Savage JRK et al. (2000) Interchromosomal distribution of gamma ray-induced chromatid aberrations in Chinese hamster ovary cells. *Genetics and Molecular Biology*, 23 (4) 1071-1076

- 
- [138] Rosenberg B, Van Camp L, Trosco JE, MANSOUR VH (1969) Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature*, 222 (5191) 385-386
- [139] Jamieson ER, Lippard SJ (1999) Structure, recognition, and processing of cisplatin–DNA adducts. *Chemical Reviews*, 99 (9) 2467-2498
- [140] Bosl GJ, Bajorin DF, Sheinfeld J (2001) Cancer of the testis. In: *Cancer: Principles and practice of oncology* (eds. DeVita VTJ, Hellman S, Rosenberg SA) 6th edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
- [141] Wong E, Giandomenico CM (1999) Current status of platinum-based antitumor drugs. *Chemical Reviews*, 99 (9) 2451-2466
- [142] Decatris MP, Sundar S, O'Byrne KJ (2004) Platinum-based chemotherapy in metastatic breast cancer: current status. *Cancer Treatment Reviews*, 30 (1) 53-81
- [143] Hromas RA, North JA, Burns CP (1987) Decreased cisplatin uptake by resistant L1210 leukemia cells. *Cancer Letters*, 36 (2) 197-201
- [144] Mann SC, Stephen PA, HSB (1991) Modulation of cis-diamminedichloroplatinum(II) accumulation and sensitivity by forskolin and 3-isobutyl-1-methylxanthine in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cells. *International Journal of Cancer*, 48 (6) 866-872
- [145] Binks SP, Dobrota M (1990) Kinetics and mechanism of uptake of platinum-based pharmaceuticals by the rat small intestine. *Biochemical Pharmacology*, 40 (6) 1329-1336
- [146] Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I (2002) Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (22) 14298-14302
- [147] Holzer AK, Samimi G, Katano K, Naerdemann W, Lin X et al. (2004) The copper influx transporter human copper transport protein 1 regulates the

- uptake of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Molecular Pharmacology*, 66 (4) 817-823
- [148] Roberts JJ, PASCOE JM (1972) Cross-linking of complementary strands of DNA in mammalian cells by antitumour platinum compounds. *Nature*, 235 (5336) 282-284
- [149] Rauko P, Novotny L, Balazova E (1993) DNA breakage and inactivation resulting from hydroxylamine and/or cis-Diamminedichloroplatinum(II) interactions with plasmid DNA. *International Journal of Biochemistry*, 25 (10) 1475-1481
- [150] Goodgame DML, Jeeves I, Phillips FL, Skapski AC (1975) Possible mode of action of anti-tumour platinum drugs: X-ray evidence for cis binding by platinum of two inosine 5'-monophosphate molecules via the N(7) positions. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 378 (1) 153-157
- [151] Patterson MK, Dell'Orco RT (1978) Preparation of McCoy's medium 5A. *Tissue Culture Association Manual*, 4 (1) 737-740
- [152] National Institute of Standards & Technology (2008) Certificate of analysis - standard reference material 2976, Mussel tissue (Trace elements and methylmercury).
- [153] Smith JF (1975) Thorium: Preparation and properties. 1st edition, Iowa State University Press, Ames, Iowa
- [154] Souci, Fachmann, Kraut (2000) Die Zusammensetzung der Lebensmittel. Nährwert-Tabellen. 6. Auflage, Medpharm, Stuttgart
- [155] Ternes W, Täufel A, Tunger L, Zobel M (2005) Lebensmittel-Lexikon. 4. Auflage, Behr Verlag, Hamburg
- [156] Jorhem L, Sundström B, Åstrand C, Haegglund G (1989) The levels of zinc, copper, manganese, selenium, chromium, nickel, cobalt, and aluminium in the meat, liver and kidney of swedish pigs and cattle. *Zeitschrift Für Lebensmitteluntersuchung Und -Forschung A*, 188 (1) 39-44

- 
- [157] New Wave Technologies (2004) Ablationskammervolumen laut Herstellerangabe. <http://www.new-wave.com/>,
- [158] Hollemann AF, Wiberg E, Wiberg N (1995) Lehrbuch der Anorganischen Chemie. 101. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin
- [159] Otto M (2006) Analytische Chemie. 3. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim
- [160] Gey MH (2000) Instrumentelle Bioanalytik. 1. Auflage, Springer Verlag, Wiesbaden
- [161] Westermeier R (2005) Electrophoresis in practice - A laboratory manual of proteome analysis. 4th edition, Wiley-VCH, Weinheim
- [162] Raymond S, Weintraub L (1959) Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. Science, 130 (3377) 711
- [163] Mikkelsen SR, Corton E (2004) Bioanalytical chemistry. 1st edition, John Wiley & Sons, Hoboken, USA
- [164] Larsen EH, Sturup S (1994) Carbon-enhanced inductively coupled plasma mass spectrometric detection of arsenic and selenium and its application to arsenic speciation. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 9 (10) 1099-1105
- [165] Kromidas S (1999) Validierung in der Analytik. 1. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim
- [166] Kalayda GV, Zhang G, Abraham T, Tanke HJ, Reedijk J (2005) Application of fluorescence microscopy for investigation of cellular distribution of dinuclear platinum anticancer drugs. Journal of Medicinal Chemistry, 48 (16) 5191-5202
- [167] Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM (2001) Biochemie. 3. Auflage, Springer Verlag, Berlin
- [168] Wind M, Wesch H, Lehmann WD (2001) Protein phosphorylation degree: Determination by capillary liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. Analytical Chemistry, 73 (13) 3006-3010

- 
- [169] Feldmann J, Kindness A, Ek P (2002) Laser ablation of soft tissue using a cryogenically cooled ablation cell. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 17 (8) 813-818

## 8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ac	azentrische Chromosomenaberration
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BIS	N,N'-Methylenbisacrylamid
Br	Brom
C	Kohlenstoff
CE	Kapillarelektrophorese (engl.: capillary electrophoresis)
cis-Pt	cis-Diammindichloroplatin(II)
cis-Platin	cis-Diammindichloroplatin(II)
Cl	Chlor
cps	Einzelsignale pro Sekunde (engl.: counts per second); Einheit für Signalintensitäten der ICP-MS
CSTR	kontinuierlich betriebener Rührkesselreaktor (engl.: continuous stirred-tank reactor)
dcb	Doppelstrangbruch (engl.: double chain break)
del	Deletion
d. h.	das heißt
dic	dizentrische Chromosomenaberration
engl.	englisch
etc.	et cetera
F	Fluor
FKS	Fötales Kälberserum
GC	Gaschromatographie
H	Wasserstoff
HG	Hauptgruppe
Hydrodynamic sputtering	(engl.) Partikelbildung während der Ablation auf Grund von Kelvin-Helmholtz-Instabilitäten
LA	Laser-Ablation
LA-ICP-MS	Laser-Ablation-Induktiv gekoppeltes Plasma-Massenspektrometer
lat.	lateinisch
LC	Flüssigkeitschromatographie (engl.: liquid chromatography)
I	Iod

---

ICP-AES	Induktiv gekoppeltes Plasma-Atomemissionsspektrometer
ICP-MS	Induktiv gekoppeltes Plasma-Massenspektrometer
M-Phase	Mitosephase (Phase der Zellkern- und Zellteilung)
Mo	Molybdän
MW	Mittelwert
N	Stickstoff
n. n.	nicht nachweisbar
n. q.	nicht quantifizierbar, aber nachweisbar
NIST	engl.: National Institute for Standards and Technology
O	Sauerstoff
P	Phosphor
PA	Polyacrylamid
PSE	Periodensystem der Elemente
p.a.	pro analysi (Chemikalienreinheitsangabe: für Analysen geeignet)
P/A-Faktor	Faktor um einen stufenlosen Übergang vom Pulsmodus zum Analogmodus des Detektors zu gewährleisten
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (engl. Phosphate buffered saline)
Plasma shielding	Abschirmeffekt der Ionenwolke über dem Ablationsort
quad	quadriradiale Chromosomenaberration
ring	Ringförmige Chromosomenaberration
RNA	Ribonucleinsäure (auch RNS)
RSD	relative Standardabweichung (engl.: relative standard deviation)
S	Schwefel
S.	Seite
s. a.	siehe auch
scb	Einzelstrangbruch (engl.: single chain break)
SD	Standardabweichung (engl.: standard deviation)
sog.	sogenannte
SRM	Standardreferenzmaterial (engl.: Standard reference material)
Std.-Abw.	Standardabweichung
TEMED	siehe TMEDA
TMEDA	Tetramethylethylendiamin
tri	triradiale Chromosomenaberration
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan



u.a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
ZMB	Zentrum für medizinische Biotechnologie

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schema der idealen LA-ICP-MS .....	5
Abb. 2:	Leistungsdichte eingebrachter Energie gegen ablierte Masse .....	8
Abb. 3:	Partikelgrößenspektrum (links) und chemische Zusammensetzung der einzelnen Massenfraktionen (rechts) bei der Ablation von Messing mittels 775 nm Titan-Saphir-Laser (Pulsdauer 5 ns) <sup>[59]</sup> .....	12
Abb. 4:	Zwei Teilchenklassen (Fasern und sphärische Partikel) an gefilterten Aerosolpartikeln des Standardreferenzmaterials NIST 610 auf einer Filtermembran <sup>[77]</sup> .....	12
Abb. 5:	Schematische Darstellung des primären Partikelbildungsmechanismus bis zur Bildung von Agglomeraten.....	14
Abb. 6:	Partikelbildung mittels Hydrodynamic Sputtering durch Kelvin-Helmholtz-Instabilitäten <sup>[57]</sup> .....	16
Abb. 7:	Überführungsverluste in Abhängigkeit von Partikeldurchmesser und Trägergas bei einer Überführungsstrecke von 1 m, einem Innendurchmesser von 4 mm und einer Gasflussrate von 1 L/min <sup>[55]</sup> .....	19
Abb. 8:	Simuliertes Strömungsbild in einer zylindrischen Ablationskammer mit 1L/min Helium und 2 mm Einlassdüse (zu sehen: laminare Strömungsbedingungen) <sup>[90]</sup> .....	22
Abb. 9:	Schematischer Aufbau einer Ablationskammer im „Rüsseldesign“ <sup>[85]</sup> .....	23
Abb. 10:	Simuliertes Elementsignal der LA-ICP-MS für unterschiedliche Ablationskammervolumina bei einer Gasflussrate von 1 L/min <sup>[93]</sup> .....	24
Abb. 11:	Skizze des paraboloiden Geschwindigkeitsprofils in einer laminaren Strömung in einem Schlauch <sup>[94]</sup> .....	25
Abb. 12:	Plasmafackel eines ICP-MS <sup>[99]</sup> .....	26
Abb. 13:	Schematischer Aufbau eines ICP-MS, das mit einem Laser-Ablationssystem als Probenzufuhr gekoppelt ist .....	27
Abb. 14:	Dual-Mode-Sekundärelektronenvervielfacher .....	28
Abb. 15:	Partikelgrößenspektrums eines Zerstäubers mit (rechts) und ohne (links) Sprühkammer sowie Skizze eines Zerstäubers in einer Sprühkammer (Mitte) <sup>[108]</sup> .....	30

Abb. 16:	Simulationen des Elementsignals bei unterschiedlichen Schussfrequenzen (rechts) und deren Puls-Eingangsfunktionen (links) <sup>[93]</sup> .....	33
Abb. 17:	Skizze zur Erklärung des Prinzips der Standardaddition .....	35
Abb. 18:	Polynom dritten Grades der Sensitivität eines Elan 5000 ICP-MS basierend auf der Messung von 40 Elementen (zwischen $^6\text{Li}$ und $^{238}\text{U}$ ); Einheit der Sensitivität ist $10^{-11}$ counts / (s * Atomanzahl * g Lösung) <sup>[100]</sup> .....	38
Abb. 19:	Exemplarische Fraktionierungsindices der LA-ICP-MS bei der Analyse des Standardreferenzmaterials NIST 612 mit verschiedenen UV-Laserwellenlängen (193 nm, 213 nm und 266 nm) bezogen auf $^{42}\text{Ca}$ <sup>[65]</sup> .....	39
Abb. 20:	PSE der essentiellen Elemente <sup>[1]</sup> .....	42
Abb. 21:	Das im Porphyrinring komplexierte Eisen (Häm) dient im Hämoglobin zur reversiblen Bindung von Sauerstoff.....	45
Abb. 22:	Leberläppchen humaner Leber bei 40facher Vergrößerung <sup>[125]</sup> .....	47
Abb. 23:	Phasen des Zellzyklus <sup>[127]</sup> .....	48
Abb. 24:	Phasen der Mitose (Teil I) <sup>[127]</sup> .....	49
Abb. 25:	Phasen der Mitose (Teil II) <sup>[127]</sup> .....	50
Abb. 26:	Chinesischer Hamster (lat.: <i>Cricetulus griseus</i> ).....	52
Abb. 27:	Chromosomen ( $2n = 22$ ) des chinesischen Hamsters <sup>[128]</sup> .....	52
Abb. 28:	Karyotyp der CHO9-Zelllinie mit nur 21 Chromosomen <sup>[137]</sup> (Balken 10 $\mu\text{m}$ ) .....	53
Abb. 29:	Platinbasierte Zytostatika: cis-Pt, Oxaliplatin und Carboplatin.....	54
Abb. 30:	Ligandenaustausch des cis-Platins beim Eintritt in die Zelle: Chlorid gegen Wasser .....	55
Abb. 31:	Typen von cis-Pt-DNA-Komplexen <sup>[14]</sup> .....	55
Abb. 32:	Mögliche Angriffspunkte von cis-Platin an der DNA: Die N7-Stickstoffe der DNA-Basen Guanin und Adenin .....	56
Abb. 33:	Verschiedene Typen von Chromosomenaberrationen .....	57
Abb. 34:	Selbstentwickelter Alublock mit Kühlrippen zum Schockfrieren von Gewebeproben in Cryomolds .....	72

Abb. 35:	Schema zur sequenziellen mikroskopischen und LA-ICP-MS-Untersuchung von einzelnen Zellen auf einem Objektträger (Zeile für Zeile von links nach rechts).....	78
Abb. 36:	Skizze der Gasströme innerhalb des Laser-Ablationssystems bei der Verwendung von Argon (links) bzw. Helium (rechts) als Trägergas .....	81
Abb. 37:	Mit Argon als Ablationsgas (rechts) setzt sich auf Grund einer größeren Partikelgrößenverteilung neben der Ablationsspur deutlich mehr Material aus der Gasphase ab als bei der Verwendung von Helium (links).....	83
Abb. 38:	Ablationskammerschubblade mit altem Originaleinsatz .....	85
Abb. 39:	Ablationskammerschubblade mit neuem, volumenreduzierendem Einsatz.....	85
Abb. 40:	Betrachtete Parameter zur Analyse des Auswaschverhaltens (ohne Signalintegral) .....	86
Abb. 41:	Skizze der Ablationskammer mit den untersuchten Positionen zur Bestimmung der Integrale .....	87
Abb. 42:	Ortsaufgelöste Darstellung der $^{13}\text{C}$ -Integrale der Einzelschussanalysen über den gesamten Analysenbereich der Originalablationskammer .....	87
Abb. 43:	Skizze der untersuchten Positionen in der Mitte der Ablationskammer in Gasflussrichtung auf den Zellausgang zu .....	88
Abb. 44:	Auswaschverhalten der Originalablationskammer entlang der Mittelachse in Gasflussrichtung auf den Zellausgang zu.....	88
Abb. 45:	Skizze der untersuchten Positionen in der Mitte der Ablationskammer quer zur Gasflussrichtung .....	89
Abb. 46:	Auswaschverhalten der Originalablationskammer entlang der Mittelachse quer zur Gasflussrichtung von rechts nach links .....	90
Abb. 47:	Skizze der untersuchten Positionen für die Bestimmung der Signalintegrale in der Ablationskammer .....	91
Abb. 48:	Ortsaufgelöste Darstellung der $^{13}\text{C}$ -Signalintegrale mit dem volumenreduzierten Ablationskammerdesign.....	91
Abb. 49:	Skizze der untersuchten Positionen in der Mitte der Ablationskammer in Gasflussrichtung auf den Zellausgang zu .....	92

Abb. 50:	Spitzenintensitäten der $^{13}\text{C}$ -Signale in der Mittelachse in Gasflussrichtung vom Gaseinlass in Richtung Zellausgang .....	92
Abb. 51:	Auswaschverhalten und Signalintegrale der optimierten Ablationskammer entlang der X-Mittelachse in Gasflussrichtung von unten nach oben .....	93
Abb. 52:	Skizze der untersuchten Positionen in der Mitte der Ablationskammer quer zur Gasflussrichtung .....	94
Abb. 53:	Gemessene Parameter zur Beurteilung des Auswaschverhaltens der verbesserten Ablationskammer (Querprofil entlang der x-Achse (Positionen: 0 bis 46 mm) in der Kammermitte).....	95
Abb. 54:	Simuliertes Strömungsbild in einer zylindrischen Ablationskammer mit 1 L/min Helium und 2 mm Einlassdüse (zu sehen: laminare Strömungsbedingungen) <sup>[90]</sup> .....	96
Abb. 55:	Vergleich von Linienscans in beiden Ablationskammerdesigns zum Vergleich der Signalintensitäten .....	98
Abb. 56:	Beobachtete Energiedichtedrift des verwendeten Laser-Ablationssystems LAS UP 213 FB .....	99
Abb. 57:	Kryozelle mit Kryostat und Temperatursteuerung .....	101
Abb. 58:	Altes 5L-Wasserreservoir der LA-ICP-MS von New Wave Technologies (Eheim Aquarienpumpe) .....	101
Abb. 59:	Vergleich der programmierten und tatsächlichen Temperaturen im Kern, an der Probenoberfläche und am Zellausgang (Aerosol) (genaue Werte siehe Tabelle 51, S.214 im Anhang).....	102
Abb. 60:	Zusammensetzung der volumenreduzierten Kryoablationskammer aus Inlay und Kryozelle .....	104
Abb. 61:	LA-ICP-MS-Intensitäten über das ganze PSE bei unterschiedlichen Probentemperaturen und ansonsten konstanten Analysenbedingungen .....	105
Abb. 62:	LA-ICP-MS Messung der Oxidbildungsrate (m/z 248 / m/z 232) bei unterschiedlichen Probentemperaturen und ansonsten konstanten Analysenbedingungen .....	105
Abb. 63:	Aufschluss des Standardreferenzmaterials SRM 2976 <sup>[152]</sup> : Vergleich der gefundenen Konzentrationen mit den zertifizierten Werten.....	112

Abb. 64:	Screenshot eines Linienscans des Laser-Ablations-Systems während der Analyse eines Schweineleberschnittes.....	117
Abb. 65:	Kalibrationsgerade der LA-ICP-MS zur Bestimmung von Kupfer ( $^{63}\text{Cu}$ ) in Schweineleber mittels Standardaddition .....	117
Abb. 66:	Ortsaufgelöste Kupferkonzentrationsverteilung aus einem Linienscan der LA-ICP-MS nach Kalibration mittels Standardaddition (rot: mittlere Intensität entspricht mittlerer gefundener Konzentration) .....	119
Abb. 67:	Polymerisationsreaktion von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid zu vernetztem Polyacrylamid <sup>[161]</sup> .....	122
Abb. 68:	Exemplarische Überblicksdarstellung der Elementsignale eines Linienscans der LA-ICP-MS Analyse des 20%igen Polyacrylamidgelschnitts .....	126
Abb. 69:	Abnehmende Signalintensitäten der LA-ICP-MS bei steigender Polyacrylamidkonzentration im Gelschnitt und gleichbleibender Elementstandardkonzentration.....	127
Abb. 70:	Exemplarische Darstellung der Elementsignale eines Linienscans der LA-ICP-MS-Untersuchung eines gespikten, synthetischen, matrixangepassten Kalibrationsgels .....	132
Abb. 71:	Kalibrationsgerade der LA-ICP-MS für das Isotop $^{63}\text{Cu}$ mittels synthetischer, matrixangepasster Polyacrylamid-Gele zur Untersuchung von Schweineleber.....	133
Abb. 72:	Eindimensional ortsaufgelöste Kupferverteilung eines Schweinelebergewebeschnittes aufgenommen mittels eines Linienscans des LA-ICP-MS nach dessen Kalibration mittels gespikter, synthetischer, matrixangepasster Polyacrylamid-Gelschnitte .....	134
Abb. 73:	Bild der einprogrammierten Positionen (grün) der zu untersuchenden CHO-Zellen vor der Ablation.....	144
Abb. 74:	Bild der einprogrammierten Positionen (grün) nach der Ablation .....	144
Abb. 75:	Screenshot einer mit der Zahl 6 markierten Zelle mit programmierter Position (gelber Kreis im Fadenkreuz) .....	145
Abb. 76:	Verfahrensschema bei der sequentiellen Untersuchung selektierter Zellen mittels Mikroskop und LA-ICP-MS.....	146

Abb. 77:	Kalibrationsmaster vor der Kalibrationsmessung (Zur Visualisierung wurde hier statt reinem Glas ein mit einer PVDF-Membran bespannter Objektträger verwendet) .....	149
Abb. 78:	Kalibrationsmaster nach einer Kalibrationsmessung .....	149
Abb. 79:	Exemplarisches Elementsignal ( $^{31}\text{P}$ ) der Flächenablation eines Koordinatenfeldes des Ablationsmasters .....	150
Abb. 80:	Kalibrationsgerade der LA-ICP-MS für das Isotop $^{31}\text{P}$ über fünf Größenordnungen mittels Auftropfmethode .....	150
Abb. 81:	Kalibrationsgerade der LA-ICP-MS für das Isotop $^{195}\text{Pt}$ über fünf Größenordnungen mittels Auftropfmethode .....	150
Abb. 82:	Bild eines Objektträgers mit Kalibrationsgelschnitt .....	153
Abb. 83:	$^{195}\text{Pt}$ -Signale der Analyse eines gespikten Kalibrationsgels mittels LA-ICP-MS .....	154
Abb. 84:	Kalibrationsgerade des Isotops $^{195}\text{Pt}$ bestimmt durch LA-ICP-MS-Messungen von Kalibrationsgelschnitten .....	155
Abb. 85:	Vergleich des Phosphorabbaus in CHO-Zellen durch summierte und kombinierte RNase und Pepsinbehandlung nach Kalibration mittels Auftropfmethode .....	158
Abb. 86:	Vergleich des Phosphorabbaus in CHO-Zellen durch summierte und kombinierte RNase und Pepsinbehandlung nach Kalibration mittels Gelschnittmethode .....	160
Abb. 87:	Mit 16,6 $\mu\text{M}$ cis-Pt inkubierte CHO-Zellen nach 24 h Kultivierung: Es sind kaum noch intakte Zellen sichtbar, meist nur noch Zelltrümmer .....	163
Abb. 88:	Kalibrationsgerade des LA-ICP-MS-Systems für $^{31}\text{P}$ mittels Gelschnittmethode .....	164
Abb. 89:	Kalibrationsgerade des LA-ICP-MS-Systems für $^{195}\text{Pt}$ mittels Gelschnittmethode .....	165
Abb. 90:	Mittels Laser-Ablation beschriftete Metaphase-Zelle zur lichtmikroskopischen Analyse .....	168
Abb. 91:	Dieselbe Stelle nach der Analyse mittels LA-ICP-MS .....	168
Abb. 92:	Auftreten verschiedener Typen von Chromosomenaberrationen in mit verschiedenen Konzentrationen an cis-Platin gespikten CHO-Metaphase-Zellen (jeweils N=250) .....	169

Abb. 93:	Anzahl an Chromosomenaberrationen pro Zelle gegen Spikekonzentration an cis-Pt sowie Vergleich mit Literaturwerten <sup>[16]</sup> .....	170
Abb. 94:	Auftragung der Spikekonzentration gegen gefundene Stoffmenge an cis-Platin in CHO-Metaphase-Zellen .....	171
Abb. 95:	(Zu Kapitel 4.2.1.2.4, S. 118) Kalibrationsgerade der LA-ICP-MS für <sup>24</sup> Mg mittels Standardaddition zur Quantifizierung von Konzentrationen in Schweineleber .....	216
Abb. 96:	(Zu Kapitel 4.2.1.2.4, S. 118) Kalibrationsgerade der LA-ICP-MS für <sup>55</sup> Mn mittels Standardaddition zur Quantifizierung von Konzentrationen in Schweineleber .....	216
Abb. 97:	(Zu Kapitel 4.2.1.2.4, S. 118) Kalibrationsgerade der LA-ICP-MS für <sup>56</sup> Fe mittels Standardaddition zur Quantifizierung von Konzentrationen in Schweineleber .....	217
Abb. 98:	(Zu Kapitel 4.2.1.2.4, S. 118) Kalibrationsgerade der LA-ICP-MS für <sup>57</sup> Fe mittels Standardaddition zur Quantifizierung von Konzentrationen in Schweineleber .....	217
Abb. 99:	(Zu Kapitel 4.2.1.2.4, S. 118) Kalibrationsgerade der LA-ICP-MS für <sup>66</sup> Zn mittels Standardaddition zur Quantifizierung von Konzentrationen in Schweineleber .....	218
Abb. 100:	(Zu Kapitel 4.2.2.7, S. 133) Kalibrationsgerade der LA-ICP-MS für <sup>24</sup> Mg mittels synthetischer matrixangepasster Polyacrylamid-Gelschnitte .....	224
Abb. 101:	(Zu Kapitel 4.2.2.7, S. 133) Kalibrationsgerade der LA-ICP-MS für <sup>55</sup> Mn mittels synthetischer matrixangepasster Polyacrylamid-Gelschnitte .....	224
Abb. 102:	(Zu Kapitel 4.2.2.7, S. 133) Kalibrationsgerade der LA-ICP-MS für <sup>56</sup> Fe mittels synthetischer matrixangepasster Polyacrylamid-Gelschnitte .....	225
Abb. 103:	(Zu Kapitel 4.2.2.7, S. 133) Kalibrationsgerade der LA-ICP-MS für <sup>57</sup> Fe mittels synthetischer matrixangepasster Polyacrylamid-Gelschnitte .....	225



---

Abb. 104:	(Zu Kapitel 4.2.2.7, S. 133) Ein-Punkt-Kalibrationsgerade der LA-ICP-MS für $^{59}\text{Co}$ mittels synthetischer matrixangepasster Polyacrylamid-Gelschnitte .....	226
Abb. 105:	(Zu Kapitel 4.2.2.7, S. 133) Ein-Punkt-Kalibrationsgerade der LA-ICP-MS für $^{60}\text{Ni}$ mittels synthetischer matrixangepasster Polyacrylamid-Gelschnitte .....	226
Abb. 106:	(Zu Kapitel 4.2.2.7, S. 133) Kalibrationsgerade der LA-ICP-MS für $^{66}\text{Zn}$ mittels synthetischer matrixangepasster Polyacrylamid-Gelschnitte .....	227
Abb. 107:	Exemplarische Struktur eines Phospholipids.....	229

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Hauptelemente im menschlichen Körper <sup>[1]</sup> .....	42
Tabelle 2:	In dieser Arbeit verwendete Geräte .....	58
Tabelle 3:	In dieser Arbeit verwendete Chemikalien .....	60
Tabelle 4:	Verwendete Elementstandardlösungen .....	61
Tabelle 5:	Verwendete zertifizierte Standardreferenzmaterialien .....	61
Tabelle 6:	Standard-Tuningparameter der LA-ICP-MS .....	63
Tabelle 7:	Verwendete Isotope im SRM NIST 610 zur Bestimmung der P/A-Faktoren unter Standardtuneparametern .....	64
Tabelle 8:	Ablationsparameter zur Untersuchung des Auswaschverhaltens der Ablationskammer .....	65
Tabelle 9:	ICP-MS-Parameter zur Untersuchung des Auswaschverhaltens der Ablationskammer .....	65
Tabelle 10:	Arbeitsparameter der Kryozelle .....	66
Tabelle 11:	Kalibrierte Isotope und Kalibrationsbereich der mittels Aufschluss bestimmten Elemente .....	68
Tabelle 12:	Ansatz der Multielementstammlösung für die Standardaddition .....	69
Tabelle 13:	Einwaagen an Acrylamid/BIS-Mischung zur Nachahmung verschiedener Analysenmatrizes und die resultierende Polyacrylamidkonzentration im Gel .....	70
Tabelle 14:	Zusammensetzung der Multielementstandardlösungen zum Ansatz der synthetischen Kalibrationsgele .....	71
Tabelle 15:	Parameter des Kryomikrotoms zum Gewebe- und Gelschnitt .....	73
Tabelle 16:	Laser-Ablations-Parameter zur Analyse von Gewebeschnitten .....	74
Tabelle 17:	Geräteparameter zur Einzelzellenuntersuchung mittels LA-ICP-MS ....	77
Tabelle 18:	Vergleich der Tuning-Signale für die Ablationsgase Argon und Helium bei der Untersuchung von NIST 612 .....	82
Tabelle 19:	Vergleich der Trägergase Argon und Helium bei der Untersuchung von NIST 612 (Bildungsraten der Oxide und doppelt geladenen Ionen sowie Detektorrauschen) .....	83
Tabelle 20:	Geeignete Isotope im SRM NIST 610 zur Bestimmung der P/A-Faktoren unter Standardtuneparametern .....	84
Tabelle 21:	Vergleich der Auswaschparameter der beiden Kammerdesigns .....	98

Tabelle 22:	Wassergehaltsbestimmung von Schweineleber .....	108
Tabelle 23:	Bestimmung des Glührests von getrockneter Leber .....	109
Tabelle 24:	Analysenergebnis der Elementaranalyse von getrockneter Schweineleber .....	110
Tabelle 25:	CHNSO-Zusammensetzung von unbehandelter Schweineleber .....	110
Tabelle 26:	Mittels ICP-MS bestimmte Elementkonzentrationen in der Schweineleber .....	111
Tabelle 27:	Elemente der Spikestammlösung mit der jeweiligen Ursubstanz und Zielkonzentration .....	114
Tabelle 28:	Vergleich der theoretisch angesetzten (eingewogenen) mit den tatsächlich gefundenen Konzentrationen der Multielementstammlösung zur Standardadditionskalibration .....	115
Tabelle 29:	Vergleich der gefundenen Elementkonzentrationen in Schweineleber aus dem Aufschluss mit den Ergebnissen der mittels Standardaddition kalibrierten LA-ICP-MS .....	118
Tabelle 30:	Nachweisgrenzen des Standardadditionsverfahrens für die Bestimmung von Elementkonzentrationen in Schweineleber .....	120
Tabelle 31:	Synthetische Matrix Polyacrylamid vs. natürliche Matrix .....	121
Tabelle 32:	CHNO-Verhältnisse der Komponenten der synthetischen Matrix .....	123
Tabelle 33:	Vergleich der CHNO-Verhältnisse der Real- und der synthetischen Matrices .....	124
Tabelle 34:	Konzentrationen der Multielementspikelösung zum Ansatz der Gele unterschiedlichen PA-Gehalts .....	125
Tabelle 35:	Zusammensetzung der Multielementstandardlösungen zum Ansatz der synthetischen Kalibrationsgele .....	128
Tabelle 36:	Durch Gelkomponenten eingetragene Hintergrundkonzentrationen im synthetischen, matrixnachahmenden Polyacrylamid-Gel .....	130
Tabelle 37:	Nachweisgrenzen der mittels synthetischer, matrixangepasster Polyacrylamid-Gelschnitte kalibrierten LA-ICP-MS .....	135
Tabelle 38:	Vergleich der Quantifizierungsergebnisse von Schweineleber der mittels synthetischer, matrixangepasster Polyacrylamid-Gelschnitte kalibrierten LA-ICP-MS mit den ICP-MS-Ergebnissen des aufgeschlossenen Schweinelebergewebes .....	137

Tabelle 39:	Vergleich der Quantifizierungsergebnisse von Schweineleber der mittels synthetischer, matrixangepasster Polyacrylamid-Gelschnitte und der mittels Standardaddition kalibrierten LA-ICP-MS.....	139
Tabelle 40:	Gegenüberstellung der Nachweisgrenzen beider angewandeter Kalibrationsverfahren.....	140
Tabelle 41:	Anwendungsrelevante Eigenschaften der beiden angewandten Kalibrationsmethoden.....	141
Tabelle 42:	Gegenüberstellung der Geräteparameter der LA-ICP-MS zur Kalibration durch aufgetropfte Standards und zur Einzelzellenuntersuchung.....	151
Tabelle 43:	Eckdaten der beiden Kalibrationsmethoden.....	156
Tabelle 44:	Phosphorgehalt behandelter CHO-Zellen nach Kalibration mittels Auftropfmethode.....	158
Tabelle 45:	Phosphorgehalt behandelter CHO-Zellen nach Kalibration mittels Gelschnittmethode.....	160
Tabelle 46:	Phosphor- und Platingehalt der cis-Pt inkubierten CHO-Zellen.....	162
Tabelle 47:	Phosphorgehalt der mit 12,45 µM cis-Pt inkubierten CHO-Zellen .....	165
Tabelle 48:	Platingehalt der mit 12,45 µM cis-Pt inkubierten CHO-Zellen.....	166
Tabelle 49:	Platingehalt in cis-Platin gespickten CHO-Metaphasen .....	170
Tabelle 50:	(Zu Kapitel 4.1.5.2, Abb. 59, S. 104) Charakterisierung der Temperaturverteilung in der Kryozelle: Programmierte Temperatur gegen Kern-, Oberflächen- und Gastemperatur am Zellausgang.....	213
Tabelle 51:	(Zu Kapitel 4.1.5.4, Abb. 61, S. 107) Untersuchung des Effekts der Proben temperatur auf die Signalintensität der LA-ICP-MS anhand der Ablation eines gespickten Polyacrylamid-Gelschnittes .....	214
Tabelle 52:	(Zu Kapitel 4.2.1.1.4, Abb. 63, S. 114) Vergleich der gefundenen Element-konzentrationen mit den zertifizierten Werten des Standardreferenzmaterials SRM 2976 als Validierung der Ergebnisse der Gewebeaufschluss- und ICP-MS-Untersuchungsmethode zur Charakterisierung der Probenmatrix Schweineleber.....	215
Tabelle 53:	(Zu Kapitel 4.2.2.4, Abb. 69, S. 129) Vergleich der Signalintensitäten der LA-ICP-MS bei der Untersuchung von	

---

	Polyacrylamidgelschnitten	mit	unterschiedlichen	
	Polyacrylamidgehalten	bei	gleichen	gespikten
	Analytkonzentrationen .....			219
Tabelle 54:	Vergleich der angesetzten Konzentrationen in synthetischen,			
	matrixangepassten Kalibrationsgelen aus Polyacrylamid mit			
	Aufschlussdaten derselben .....			221
Tabelle 55:	Dauer der Phasen des Zellzyklus einer CHO-Zelle <sup>[13]</sup> .....			227
Tabelle 56:	Zur Berechnung der durchschnittlichen DNA-Menge einer nicht			
	synchronisierten CHO-Zelle .....			228

## 11 Anhang

### 11.1 Untersuchungen zum Kryozellensystem

**Tabelle 50:** (Zu Kapitel 4.1.5.2, Abb. 59, S. 102) Charakterisierung der Temperaturverteilung in der Kryozelle: Programmierte Temperatur gegen Kern-, Oberflächen- und Gastemperatur am Zellausgang

Programmierte Temperatur in °C	Temperatur im Kern in °C	Temperatur an der Oberfläche in °C	Temperatur am Zellausgang in °C
20,4	20,4	20,5	22,4
15,4	15,4	16,3	17,3
10,4	10,4	11,6	13,5
5,4	5,1	6,5	10,3
0,0	0,0	1,8	7,1
-5,4	-5,4	-3,8	6,8
-10,4	-10,4	-8,1	5,4
-15,4	-15,4	-11,2	4,5
-20,4	-20,3	-12,3	2,6
-25,4	-25,4	-20,4	-2,2
-30,4	-30,4	-23,6	-6,1

**Tabelle 51: (Zu Kapitel 4.1.5.4, Abb. 61, S. 105) Untersuchung des Effekts der Probentemperatur auf die Signalintensität der LA-ICP-MS anhand der Ablation eines gespikten Polyacrylamid-Gelschnittes**

Eingestellte Probentemperatur	0°C		-5°C		-10°C	
Element	Signal in cps	SD	Signal in cps	SD	Signal in cps	SD
B11	18255	3038	18970	2427	21001	5267
Si29	6862150	513274	7344890	531771	7426150	1451110
K39	433576	79663	527334	117833	468776	134790
Mn55	59103	5396	62584	5461	61407	11497
Fe56	96207	8884	142089	344398	104336	20112
Fe57	15835	2012	17181	1640	17056	3204
Co59	39964	4153	42997	4204	43998	8620
Cu63	25002	3326	25642	2737	27266	5816
Rb85	64582	6548	67761	6118	70210	15815
Sr88	143912	12126	148677	10356	140318	23750
Ag107	20876	1892	20611	1815	21727	5054
Xe129	1852	477	1687	412	1770	469
La139	62616	5655	63506	4511	57864	9890
Pb208	47847	4244	48631	4405	48522	10308

Fortsetzung Tabelle 51:

Eingestellte Probentemperatur	-15 °C		-20 °C		-25 °C	
Element	Signal in cps	SD	Signal in cps	SD	Signal in cps	SD
B11	18830	3001	20058	4407	16893	2627
Si29	7172690	619933	8046530	1579800	6291080	459777
K39	498089	144749	695447	245374	519090	110914
Mn55	61046	5898	69589	13849	53302	4591
Fe56	107700	21540	111307	19899	134379	565915
Fe57	17925	2121	21044	4451	16741	1954
Co59	42198	5089	46669	9778	36304	3448
Cu63	25475	3072	28478	6319	22768	3139
Rb85	66899	7333	76146	18229	58460	5442
Sr88	141949	12618	169575	35459	129095	11418
Ag107	20420	2634	22736	5402	18249	1909
Xe129	1760	430	1743	384	1824	462
La139	59185	4967	71285	14267	54816	4382
Pb208	48208	6051	53352	11803	41943	5523

## 11.2 **Zur Gesamtmittelbestimmung des Lebergewebes:**

### **Untersuchung des SRM 2976**

**Tabelle 52: (Zu Kapitel 4.2.1.1.4, Abb. 63, S. 112) Vergleich der gefundenen Elementkonzentrationen mit den zertifizierten Werten des Standardreferenzmaterials SRM 2976 als Validierung der Ergebnisse der Gewebeaufschluss- und ICP-MS-Untersuchungsmethode zur Charakterisierung der Probenmatrix Schweineleber**

Element	SRM 2976 zertifizierte Werte [µg/g]	Standard- abweichung [µg/g]	SRM 2976 gefundene Werte [µg/g]	Standard- Abweichung [µg/g]
Mg 24	5300	500	4354,139	520
Ca 43	7600	300	6460,258	655
Ca 44	7600	300	6743,401	617
Fe 54	171	4,9	169,748	9,49
Mn 55	33	2	31,576	0,58
Fe 56	171	4,9	203,332	22,9
Fe 57	171	4,9	193,810	18,4
Co 59	0,61	0,02	0,533	0,064
Ni 60	0,93	0,12	0,975	0,108
Cu 63	4,02	0,33	4,173	0,106
Cu 65	4,02	0,33	4,050	0,103
Zn 66	137	13	146,270	3,403
Zn 68	137	13	148,764	3,521
Sn 116	0,096	0,039	0,842	0,072
Sn 118	0,096	0,039	0,654	0,090
Sn 120	0,096	0,039	0,459	0,052



### 11.3 Kalibrationsgeraden der LA-ICP-MS mittels Standardaddition zur Bestimmung von Elementkonzentrationen in Schweineleber

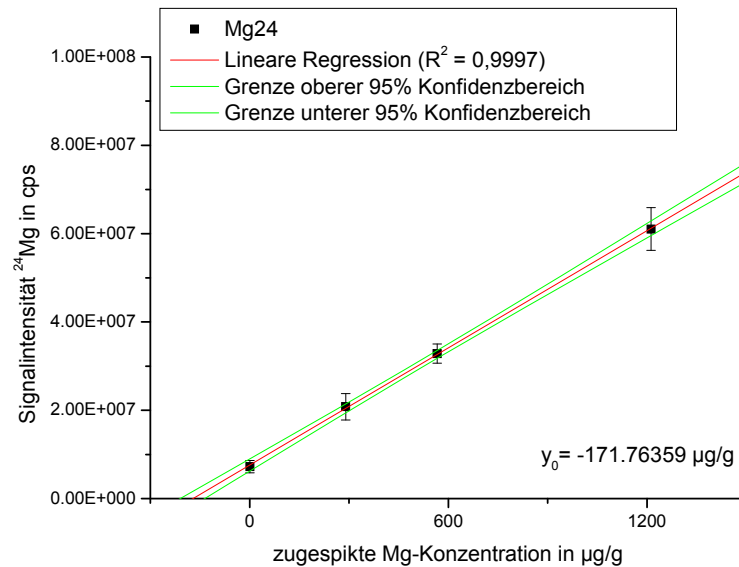


Abb. 95: (Zu Kapitel 4.2.1.2.4, S. 116) Kalibrationsgerade der LA-ICP-MS für  $^{24}\text{Mg}$  mittels Standardaddition zur Quantifizierung von Konzentrationen in Schweineleber

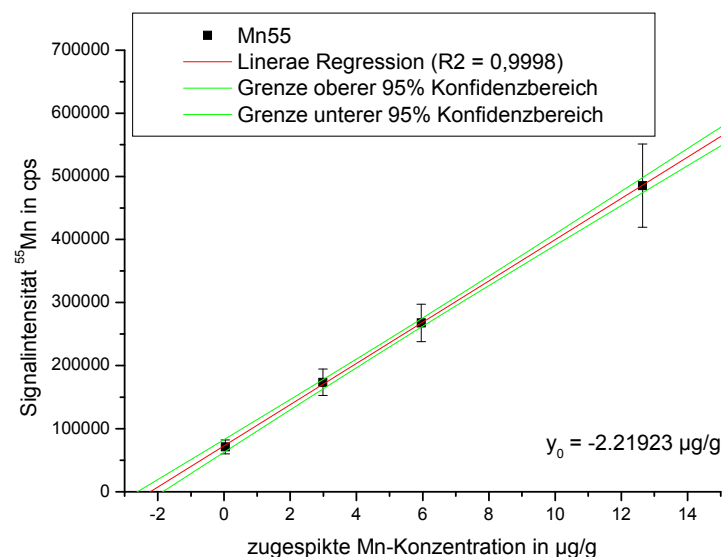
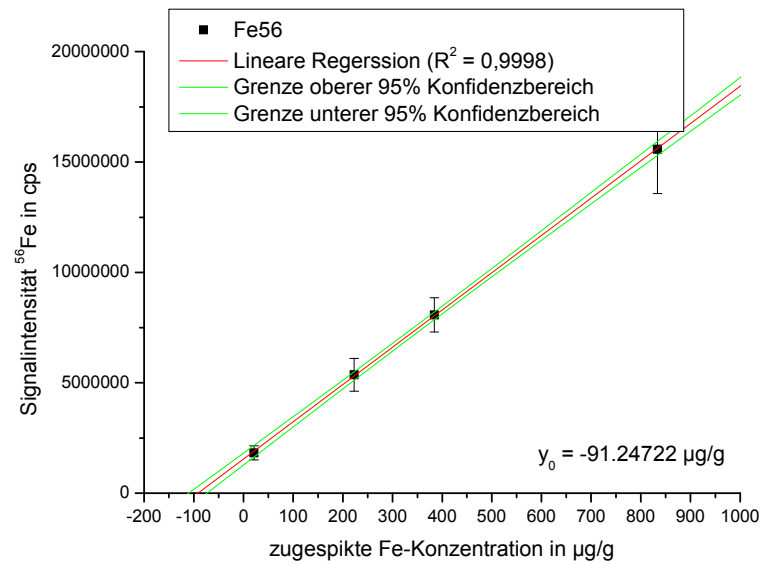
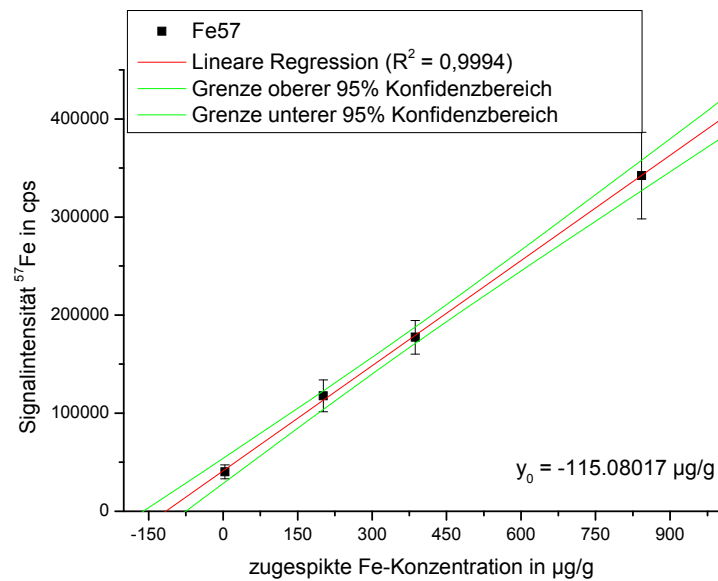


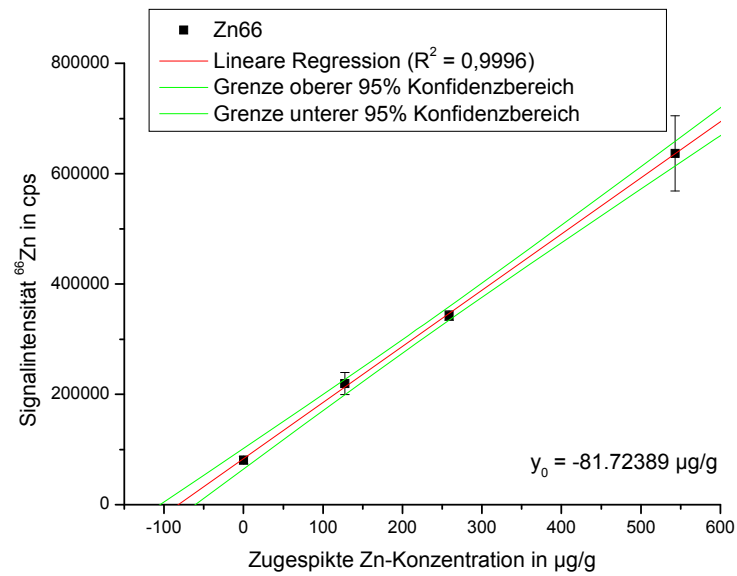
Abb. 96: (Zu Kapitel 4.2.1.2.4, S. 116) Kalibrationsgerade der LA-ICP-MS für  $^{55}\text{Mn}$  mittels Standardaddition zur Quantifizierung von Konzentrationen in Schweineleber



**Abb. 97:** (Zu Kapitel 4.2.1.2.4, S. 116) Kalibrationsgerade der LA-ICP-MS für  $^{56}\text{Fe}$  mittels Standardaddition zur Quantifizierung von Konzentrationen in Schweineleber



**Abb. 98:** (Zu Kapitel 4.2.1.2.4, S. 116) Kalibrationsgerade der LA-ICP-MS für  $^{57}\text{Fe}$  mittels Standardaddition zur Quantifizierung von Konzentrationen in Schweineleber



**Abb. 99:** (Zu Kapitel 4.2.1.2.4, S. 116) Kalibrationsgerade der LA-ICP-MS für  $^{66}\text{Zn}$  mittels Standardaddition zur Quantifizierung von Konzentrationen in Schweineleber

## 11.4 Einfluss der PA-Konzentration auf das Analyseergebnis

**Tabelle 53:** (Zu Kapitel 4.2.2.4, Abb. 69, S. 127) Vergleich der Signalintensitäten der LA-ICP-MS bei der Untersuchung von Polyacrylamidgelschnitten mit unterschiedlichen Polyacrylamidgehalten bei gleichen gespickten Analytkonzentrationen

PA-Gehalt	20%		15%	
	Signalintensität	Std.-Abw.	Signalintensität	Std.-Abw.
	cps		cps	
<sup>13</sup> C	332246	38052	378055	26391
<sup>24</sup> Mg	7787415	1528440	13548779	2603049
<sup>31</sup> P	6501	919	7719	1065
<sup>43</sup> Ca	44341	9353	76885	16843
<sup>55</sup> Mn	72383	14514	102500	16656
<sup>56</sup> Fe	3202548	632067	4497428	699526
<sup>57</sup> Fe	85087	17151	117220	17038
<sup>59</sup> Co	376,6	209,7	483,0	247,7
<sup>60</sup> Ni	437,5	212,5	650,8	284,9
<sup>63</sup> Cu	166215	31732	223184	37250
<sup>66</sup> Zn	277242	41379	373866	20607
<sup>118</sup> Sn	69001	13008	97430	16644
<sup>121</sup> Sb	612,2	283,6	656,1	251,9

Fortsetzung Tabelle 53:

PA-Gehalt	10%		5%	
	Signalintensität	Std.-Abw.	Signalintensität	Std.-Abw.
	cps		cps	
<sup>13</sup> C	294313	24990	298465	28662
<sup>24</sup> Mg	15673675	2604230	23461104	3070073
<sup>31</sup> P	8455	993	10226	1090
<sup>43</sup> Ca	91442	15301	139516	15250
<sup>55</sup> Mn	102233	7531	128234	12535
<sup>56</sup> Fe	4524830	318173	5400412	464393
<sup>57</sup> Fe	116671	9872	146523	32841
<sup>59</sup> Co	482,5	256,1	807,4	329,3
<sup>60</sup> Ni	547,5	273,6	1981,7	1267,7
<sup>63</sup> Cu	227951	17330	268948	36226
<sup>66</sup> Zn	343983	32152	492141	33638
<sup>118</sup> Sn	120632	20850	135744	21599
<sup>121</sup> Sb	572,5	273,6	851,9	265,1

## 11.5 *Zum Ansatz der synthetischen, matrixangepassten Kalibrationsgelschnitte*

**Tabelle 54: Vergleich der angesetzten Konzentrationen in synthetischen, matrixangepassten Kalibrationsgelen aus Polyacrylamid mit Aufschlussdaten derselben**

Kalibrationsgel angesetzt mit einer 1:19 Verdünnung der Multielementstammlösung				
Isotop	Konzentration in µg/g	SD	Konzentration Aufschluss in µg/g	SD
<sup>24</sup> Mg	600,234	16,624	631,767	12,547
<sup>43</sup> Ca	151,665	4,044	158,017	3,480
<sup>44</sup> Ca	147,769	3,319	153,430	2,660
<sup>55</sup> Mn	6,313	0,118	6,638	0,113
<sup>56</sup> Fe	406,803	7,976	429,630	9,340
<sup>57</sup> Fe	409,756	4,568	444,641	8,906
<sup>59</sup> Co	0,021	0,001	0,021	0,000
<sup>60</sup> Ni	0,180	0,005	0,179	0,003
<sup>63</sup> Cu	49,099	0,966	51,502	1,135
<sup>65</sup> Cu	50,188	1,409	52,057	0,832
<sup>66</sup> Zn	274,027	6,811	202,333	3,167
<sup>68</sup> Zn	277,462	7,429	205,943	2,228
<sup>116</sup> Sn	0,144	0,012	0,100	0,008
<sup>118</sup> Sn	0,211	0,014	0,133	0,012
<sup>120</sup> Sn	0,147	0,010	0,099	0,006

**Fortsetzung Tabelle 54:**

Kalibrationsgel angesetzt mit einer 1:39 Verdünnung der Multielementstammlösung				
Isotop	Konzentration in µg/g	SD	Konzentration Aufschluss in µg/g	SD
<sup>24</sup> Mg	300,117	14,085	315,243	7,528
<sup>43</sup> Ca	75,833	4,556	79,214	2,088
<sup>44</sup> Ca	73,885	2,318	76,403	1,596
<sup>55</sup> Mn	3,156	0,107	3,336	0,068
<sup>56</sup> Fe	203,401	7,037	216,600	5,604
<sup>57</sup> Fe	204,878	7,747	221,008	5,343
<sup>59</sup> Co	0,011	0,002	0,011	0,000
<sup>60</sup> Ni	0,090	0,007	0,089	0,002
<sup>63</sup> Cu	24,550	0,685	25,910	0,681
<sup>65</sup> Cu	25,094	0,828	25,862	0,499
<sup>66</sup> Zn	137,014	5,549	100,611	1,900
<sup>68</sup> Zn	138,731	4,725	103,165	1,337
<sup>116</sup> Sn	0,072	0,017	0,051	0,005
<sup>118</sup> Sn	0,105	0,009	0,066	0,007
<sup>120</sup> Sn	0,074	0,007	0,050	0,003

**Fortsetzung Tabelle 54:**

Kalibrationsgel angesetzt mit einer 1:79 Verdünnung der Multielementstammlösung				
Isotop	Konzentration in µg/g	SD	Konzentration Aufschluss in µg/g	SD
<sup>24</sup> Mg	150,059	8,451	157,397	4,517
<sup>43</sup> Ca	37,916	2,733	39,815	1,253
<sup>44</sup> Ca	36,942	1,391	38,283	0,958
<sup>55</sup> Mn	1,578	0,064	1,655	0,041
<sup>56</sup> Fe	101,701	4,222	107,732	3,362
<sup>57</sup> Fe	102,439	4,648	110,824	3,206
<sup>59</sup> Co	0,005	0,001	0,005	0,000
<sup>60</sup> Ni	0,045	0,004	0,045	0,001
<sup>63</sup> Cu	12,275	0,411	12,904	0,409
<sup>65</sup> Cu	12,547	0,497	13,089	0,300
<sup>66</sup> Zn	68,507	3,329	50,471	1,140
<sup>68</sup> Zn	69,365	2,835	51,190	0,802
<sup>116</sup> Sn	0,036	0,010	0,025	0,003
<sup>118</sup> Sn	0,053	0,006	0,033	0,004
<sup>120</sup> Sn	0,037	0,004	0,025	0,002



## 11.6 Kalibrationsgeraden der LA-ICP-MS durch die Kalibration mittels gespikter, synthetischer matrixangepasster Polyacrylamid-Gelschnitte

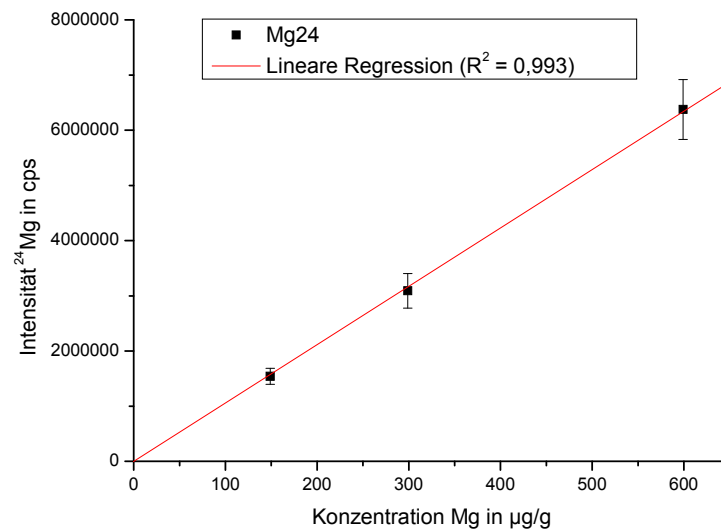


Abb. 100: (Zu Kapitel 4.2.2.7, S. 131) Kalibrationsgerade der LA-ICP-MS für  $^{24}\text{Mg}$  mittels synthetischer matrixangepasster Polyacrylamid-Gelschnitte

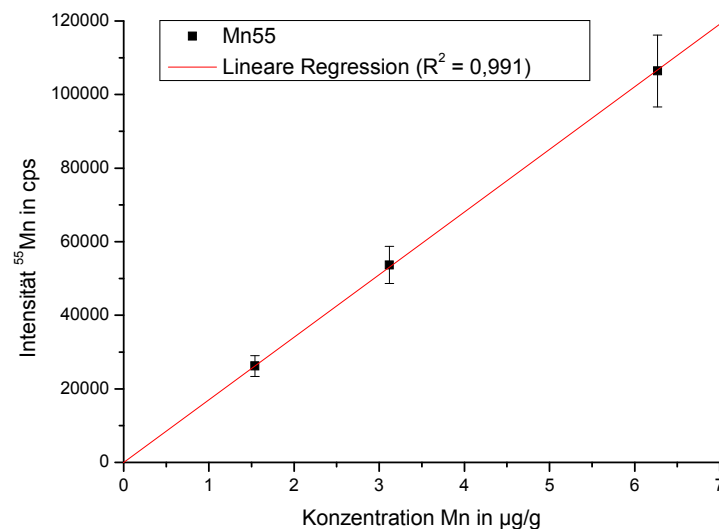
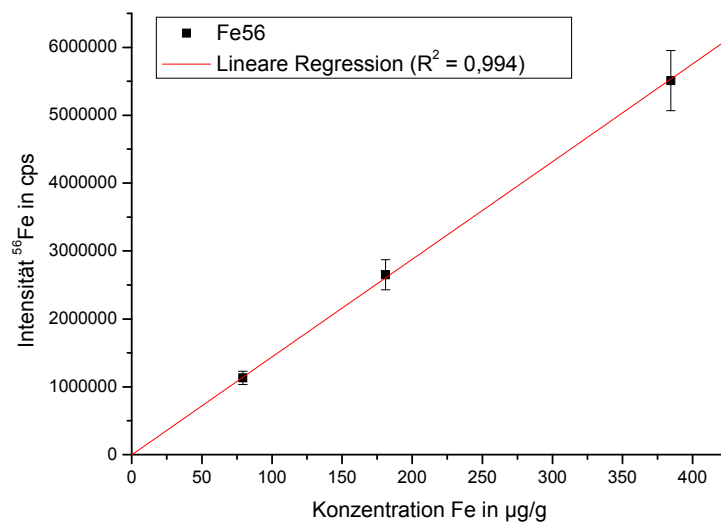
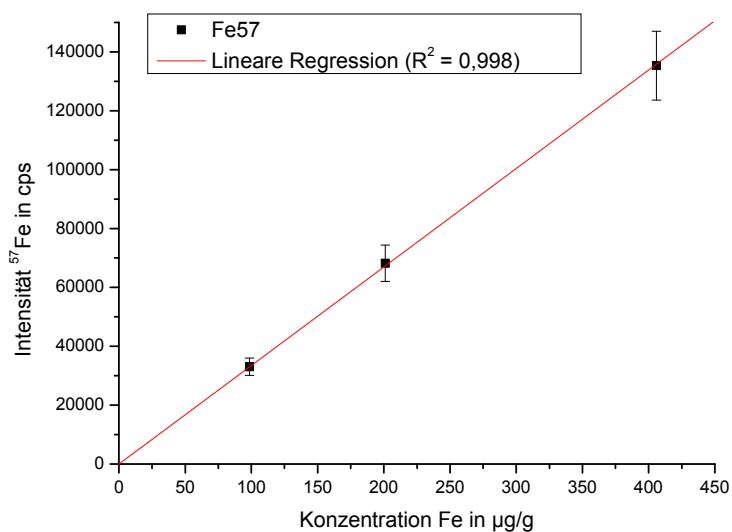


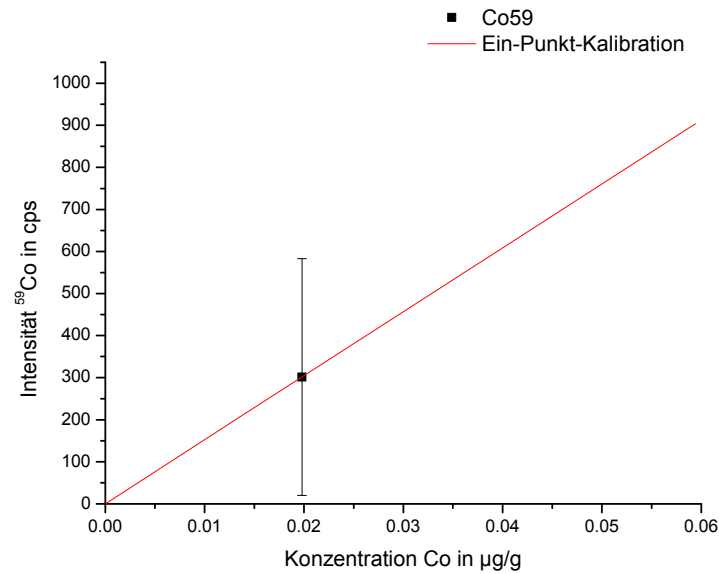
Abb. 101: (Zu Kapitel 4.2.2.7, S. 131) Kalibrationsgerade der LA-ICP-MS für  $^{55}\text{Mn}$  mittels synthetischer matrixangepasster Polyacrylamid-Gelschnitte



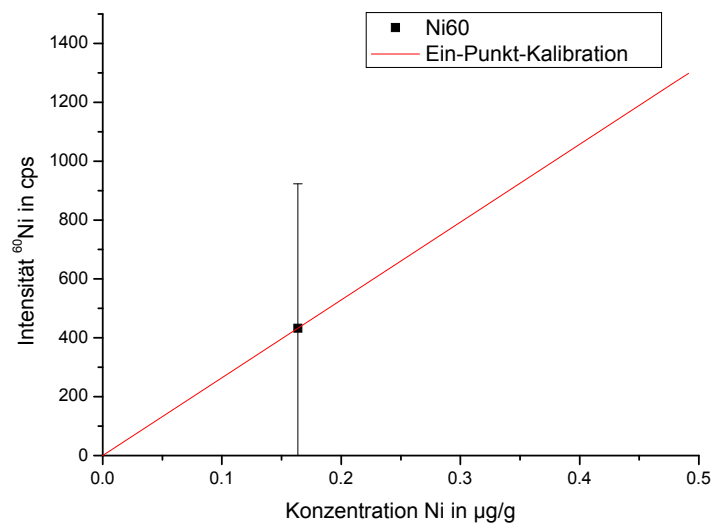
**Abb. 102:** (Zu Kapitel 4.2.2.7, S. 131) Kalibrationsgerade der LA-ICP-MS für  $^{56}\text{Fe}$  mittels synthetischer matrixangepasster Polyacrylamid-Gelschnitte



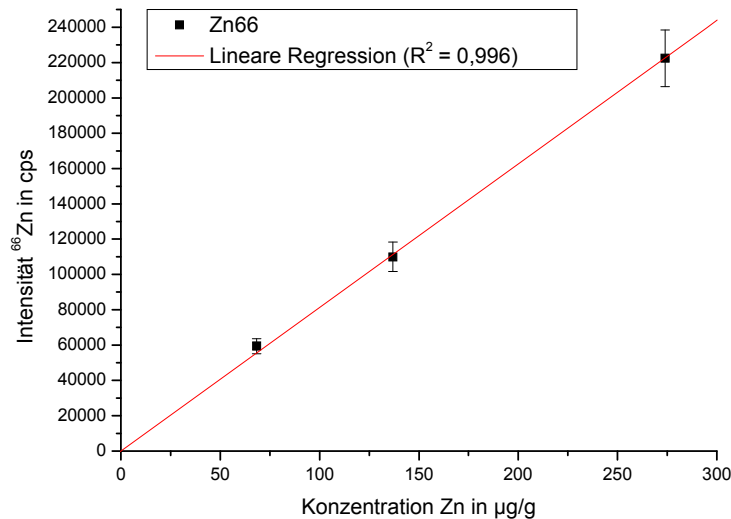
**Abb. 103:** (Zu Kapitel 4.2.2.7, S. 131) Kalibrationsgerade der LA-ICP-MS für  $^{57}\text{Fe}$  mittels synthetischer matrixangepasster Polyacrylamid-Gelschnitte



**Abb. 104:** (Zu Kapitel 4.2.2.7, S. 131) Ein-Punkt-Kalibrationsgerade der LA-ICP-MS für  $^{59}\text{Co}$  mittels synthetischer matrixangepasster Polyacrylamid-Gelschnitte



**Abb. 105:** (Zu Kapitel 4.2.2.7, S. 131) Ein-Punkt-Kalibrationsgerade der LA-ICP-MS für  $^{60}\text{Ni}$  mittels synthetischer matrixangepasster Polyacrylamid-Gelschnitte



**Abb. 106:** (Zu Kapitel 4.2.2.7, S. 131) Kalibrationsgerade der LA-ICP-MS für <sup>66</sup>Zn mittels synthetischer matrixangepasster Polyacrylamid-Gelschnitte

### 11.7 *Berechnung der Masse an DNA und des daraus resultierenden Phosphorgehalts einer durchschnittlichen, nicht synchronisierten CHO-Interphase-Zelle unter Berücksichtigung der Länge der Phasen des Zellzyklus*

Zur Berechnung des durchschnittlich in einer nicht synchronisierten CHO-Interphase-Zelle vorkommenden Gehalts an DNA müssen zunächst die Längen der einzelnen Phasen des Zellzyklus bekannt sein. Diese wurden bereits 1964 von Puck et al.<sup>[13]</sup> untersucht und lauten wie folgt:

**Tabelle 55:** Dauer der Phasen des Zellzyklus einer CHO-Zelle<sup>[13]</sup>

Phase des Zellzyklus	Dauer	Relativer DNA-Gehalt
G1-Phase	4,71 ± 0,18 h	1x
S-Phase	4,13 ± 0,31 h	1x bis 2x
G2-Phase	2,81 ± 0,33 h	2x
Mitose	0,81 ± 0,12 h	2x
Gesamtdauer des Zellzyklus	12,41 ± 0,31 h	

Der DNA-Gehalt einer CHO-Zelle in der G1-Phase entspricht 0,61 pg (siehe Kapitel 4.3.2.3.2, S. 157). Im Laufe der S-Phase verdoppelt er sich und bleibt anschließend während der G2-Phase bis zur Mitose konstant auf doppeltem Niveau.

Zur Berechnung des durchschnittlichen DNA-Gehalts einer nicht synchronisierten CHO-Interphase-Zelle wird jeweils der Anteil der Phasen mit einfachem bzw. doppeltem Gehalt an der Gesamtdauer des Zellzyklus ermittelt. Da die Verdoppelung der DNA-Menge in der S-Phase erfolgt, wird deren halbe Dauer zu beiden Zeiten addiert. Durch Multiplikation der anteiligen Dauern mit den entsprechenden DNA-Mengen und anschließendem Summieren erhält man mit 0,89 pg die durchschnittliche DNA-Menge einer nicht synchronisierten CHO-Zelle in der Interphase.

**Tabelle 56: Zur Berechnung der durchschnittlichen DNA-Menge einer nicht synchronisierten CHO-Zelle**

	<b>Dauer</b>	<b>Anteil</b>	<b>DNA-Menge</b>
Einfacher DNA-Gehalt	6,775 h	54,4%	0,61 pg
Doppelter DNA-Gehalt	5,685 h	45,6%	1,23 pg
Durchschnitt			0,89 pg

### **11.8      *Abschätzung des Phosphorgehalts der Zellmembran einer CHO-Zelle***

Der Phosphorgehalt der Zellmembran einer CHO-Zelle wird abgeschätzt indem angenommen wird, dass die Membran vollständig aus Phospholipiden besteht. Hierfür wird gegeneinander aufgerechnet, dass eine Zellmembran in der Realität nur aus 50-70% Phospholipiden besteht und dass in einer Zelle weitere Phospholipiddoppelmembranen vorkommen (etwa in der Hülle des Zellkerns oder der Mitochondrien)<sup>[126,127,167]</sup>.

Die Dicke einer Phospholipidschicht beträgt in Säugerzellen bei Körpertemperatur ca. 8 nm bei einer mittleren Dichte von 0,85 g/ml<sup>[127,167]</sup>. Der mittlere Durchmesser einer CHO-Zelle konnte im Mikroskop bestimmt werden mit 15 µm.

Nimmt man eine Zelle als kugelförmig an so kann man das Volumen der Phospholipide berechnen, indem man die Volumen der Zelle mit und ohne Membran berechnet und von einander abzieht.

$$d(\text{CHO9-Zelle}) = 15 \mu\text{m}$$

$$d(\text{Phospholipiddoppelschicht}) = 8 \text{nm}$$

$$r(\text{Zelle}) = 7,5 \mu\text{m}$$

$$r(\text{Zelle ohne Membran}) = 7,5 \mu\text{m} - 0,008 \mu\text{m}$$

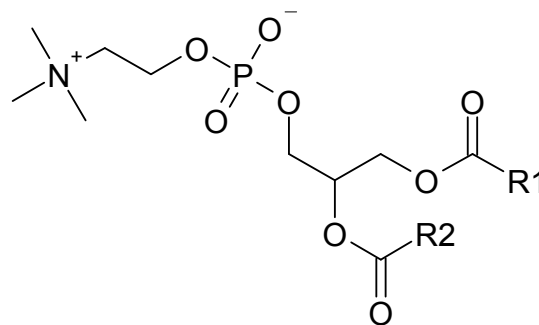
$$V_{\text{Kugel}} = \frac{4}{3} \pi r^3$$

$$V_{\text{Phospholipide}} = \frac{4}{3} \pi r(\text{Zelle})^3 - \frac{4}{3} \pi r(\text{Zelle ohne Membran})^3$$

$$V_{\text{Phospholipide}} = 5,648 \mu\text{m}^3$$

Das Volumen an Phospholipiden pro CHO-Zelle wird also mit  $5,65 \mu\text{m}^3$  abgeschätzt. Über die Dichte kann das Volumen in die Masse umgerechnet werden, so dass sich eine Masse von  $4,80 \text{ pg}$  ergibt.

Phospholipide sind Glycerinester aus zwei Fettsäuremolekülen und einem Phosphorsäurederivat mit Kopfgruppe.



**Abb. 107: Exemplarische Struktur eines Phospholipids**

Die Alkylreste R1 und R2 (vgl. Abb. 107) können sowohl symmetrisch als auch asymmetrisch sein, kommen in Kettenlängen von C10 bis C24 vor und können auch einfach ungesättigt sein, wobei im Durchschnitt eine Länge von C16 bis C18 vorliegt<sup>[126]</sup>. Es ergibt sich also eine molare Masse von  $734,1 \text{ g/mol}$  für ein C16,C18-substituiertes Phospholipid mit einer Trimethylaminoethyl-Kopfgruppe am Phosphatrest. Über den Massenanteil des Phosphors an der Gesamtmasse des Phospholipids berechnet sich die Masse von Phosphor pro CHO-Zelle. Die abgeschätzte Masse an Phosphor aus der Phospholipiddoppelmembran ergibt sich somit als  $0,20 \text{ pg}$  pro Zelle.

## 12 Publikationen

### Artikel in Journalen und Buchkapitel:

Sebastian D. Müller, Alfred V. Hirner, Wolfgang Goedecke; Simultaneous quantification of cis-Pt uptake and chromosomal aberrations on single CHO-9 cells; 2012 (in Vorbereitung)

J. Hippler, S. D. Müller, R.A.D. Reichel, M. Braescher, A.V. Hirner; R. Zdrenka, E. Dopp; Intracellular speciation of arsenic compounds in human urothelial and hepatic cells, In: *Arsenic in Geosphere and Human Diseases*; 2010, 1st edition, 339-340

T. Teltzrow, C. Hallermann, S. Müller, V. Schwipper (2006) Fremdkörperinduziertes Angiosarkom 60 Jahre nach Granatsplitterverletzung, *Mund Kiefer Gesichtschir*; 10, 415–418

Sebastian D. Müller, Roland A. Diaz-Bone, Joachim Felix, Wolfgang Goedecke (2005) Detection of specific proteins by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) using gold cluster labelled antibodies, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 20, 907-911

Posterbeiträge:

Sebastian D. Müller, Wolfgang Goedecke, Jarek Stochaki, Alfred V. Hirner (2007) Single cell quantification of platinum in chinese hamster ovary cells treated with cis-platinum (cis-diamminechloroplatinum(II)) using LA-ICP-MS: A new tool for the comparative analysis of single CHO-9 cells by LA-ICP-MS and optical microscopy, *11th Workshop on Progress in Analytical Methodologies for Trace Metal Speciation*;

Jarek Sochacki, Sebastian Müller, Alfred V. Hirner, Wolfgang Goedecke (2006) Pt quantification in single cells using LA-ICP-MS, *9th Biennial meeting of the German Society for Research on DNA Repair*, Hamburg

Sebastian Müller, Wolfgang Goedecke, Alfred V. Hirner (2006) Single cell nucleus analysis by LA-ICP-MS for investigation of mutagenicity of cis-Pt, *8th European Workshop on Laser Ablation in Elemental Analysis*, Zürich (Posterpreis)

Sebastian Müller, Ulrich Musshoff, Roland A. Diaz-Bone, Alfred V. Hirner (2006) Untersuchung orts aufgelöster Elementverteilungen im Hippocampus einer Ratte mittels Laser-Ablation-ICP-MS, *39. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie*, Mainz

Sebastian D. Müller, Roland A. Diaz-Bone, Wolfgang Goedecke, Alfred V. Hirner (2005) Proteinnachweis durch Laser-Ablation ICP-MS über Goldcluster markierte Antikörper, *Gemeinsame Herbsttagung des Hahn-Meitner-Instituts und des GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit*, Berlin

Sebastian Müller, Roland A. Diaz-Bone; Wolfgang Goedecke, Alfred V. Hirner (2005) A new Method for the Detection of Proteins by LA-ICP-MS using Goldcluster labelled Antibodies, *European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry*, Budapest



Der Lebenslauf ist aus Gründen des Datenschutzes nicht in der Online-Version enthalten.